

Philipps



Universität
Marburg

Proteintransport zum Apicoplasten von
Plasmodium falciparum
- Hinweise für einen Golgi-abhängigen Transportweg -

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sabrina Heiny
aus Freiburg

Marburg/Lahn 2013

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen
am: 10.06.2013

Erstgutachter: PD Dr. Jude M. Przyborski

Zweitgutachter: Prof. Dr. Uwe G. Maier

Tag der mündlichen Prüfung am: 20.06.2013

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind in folgendem Manuskript enthalten:

Sabrina Heiny and Jude M Przyborski. Protein traffic to the *P. falciparum* apicoplast: evidence for a sorting branch point at the Golgi. *Submitted to Traffic*.

Weitere Publikationen:

Irine Bietz, Nadine Flinner, Sabrina Heiny, Oliver Mirus and Jude M Przyborski. An Omp85-derived protein completes the apicoplast protein import pathway in apicomplexa. *In preparation*.

Heiny S, Spork S and Przyborski JM. The apicoplast of the human malaria parasite *P. falciparum*. *Endocytobiosis and Cell Research* 2012 vol. 23 pp. 91-95.

I Inhaltsverzeichnis

II Abkürzungen.....	iv
III Zusammenfassung.....	v
IV Summary	vi
1 Einleitung.....	1
1.1 Apicomplexa	1
1.1.2 Klassifizierung und phylogenetischer Ursprung der Apicomplexa	2
1.1.3 Veterinär- und humanmedizinische Relevanz der Apicomplexa.....	5
1.2 Die Malaria und ihre Erreger <i>Plasmodium</i> spp.	6
1.2.1 Malaria - Epidemiologie, Relevanz und Kontrolle	6
1.2.2 Der Lebenszyklus humanpathogener <i>Plasmodium</i> spp.....	8
1.3 <i>Plasmodium falciparum</i>	10
1.3.1 <i>Plasmodium falciparum</i> induzierte Veränderungen des infizierten Erythrozyten.....	11
1.3.2 Zellbiologie von <i>Plasmodium falciparum</i>	13
1.3.2.1 Einzigartige Kompartimente in <i>Plasmodium falciparum</i>	14
1.4 Der Apicoplast - die apicomplexe Plastide	16
1.4.1 Entdeckung und Ursprung des Apicoplasten	16
1.4.2 Funktionen des Apicoplasten	18
1.5 Der sekretorische Weg	20
1.5.1 Der frühe sekretorische Weg.....	20
1.5.2 Der späte sekretorische Weg	22
1.5.3 Der sekretorische Weg in <i>P. falciparum</i>	23
1.6 Proteintransport zum Apicoplasten	24
1.6.1 <i>Targeting</i> Signale	24
1.6.2 Transport über die äußere Apicoplasten Membran.....	26
1.6.3 Transport über die zweitäußerste Apicoplasten Membran	26
1.6.4 Transport über die zwei inneren Membranen des Apicoplasten.....	27
1.7 Ziel dieser Arbeit	29
2 Material und Methoden	30
2.1 Materialien	30
2.1.1 Geräte.....	30
2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Glaswaren.....	31
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	32
2.1.4 Materialien für die Zellkultur.....	35

2.1.5	Molekularbiologische Kits.....	35
2.1.6	Enzyme	36
2.1.7	Antikörper.....	36
2.2	Organismen	36
2.2.1	Parasitenstämme.....	36
2.2.2	Bakterienstämme	37
2.3	Oligonukleotide	37
2.3.1	Oligonukleotide für <i>P. falciparum</i> Transfektionskonstrukte	37
2.3.2	Andere Oligonukleotide.....	38
2.4	Vektoren.....	38
2.4.1	Ausgangsvektoren	38
2.4.2	<i>P. falciparum</i> Transfektionsvektoren	39
2.5	Software/Datenbanken	39
2.6	Puffer und Lösungen	40
2.7	Methoden.....	44
2.7.1	Molekularbiologische Methoden	44
2.7.2	<i>P. falciparum</i> Zellkultur	50
2.7.3	Proteinbiochemische Methoden.....	54
2.7.4	Fluoreszenzmikroskopie	56
3	Ergebnisse.....	58
3.1	C-terminale ER <i>retrieval</i> Sequenzen haben einen negativen Einfluss auf den Transport eines Reporterproteins zum Apicoplasten von <i>P. falciparum</i>	58
3.1.1	Das Hinzufügen C-terminaler ER <i>retrieval</i> Sequenzen vermindert den Transport Apicoplast-gerichteter Reporterproteine zum Apicoplasten.	59
3.1.2	Das Hinzufügen C-terminaler ER <i>retrieval</i> Sequenzen führt zu einer reduzierten Prozessierung Apicoplast-gerichteter Reporterproteine.	62
3.1.3	In Abwesenheit eines funktionellen Transitpeptids vermittelt eine -KDEL, wie eine -SDEL ER <i>retrieval</i> Sequenz, eine vollständige Rücksendung der Reporterproteine zum ER	64
3.1.4	Die -KDEL vermittelte Redistribution des Reporterproteins zum ER steigt mit abnehmender Stärke des Transitpeptids	68
3.1.5	Das Hinzufügen einer C-terminalen -KDEL Sequenz verlangsamt die dynamische Prozessierung eines Apicoplast-gerichteten Reporters im Vergleich zu einem Reporterprotein ohne ER <i>retrieval</i> Signal.....	73
3.2	Brefeldin A hat einen negativen Einfluss auf den Proteintransport zum Apicoplasten von <i>P. falciparum</i>	77
3.2.1	Generierung einer BFA-resistenten ACP ^{BTS-BFAR} Parasitenlinie	78

3.2.2	Eine Behandlung mit BFA beeinflusst die intra-erythrozytäre Entwicklung und die intrazelluläre Lokalisierung des Reporterproteins der ACP ^{BTS} Wildtyp Zelllinie, nicht aber der ACP ^{BTS_BFAR} Zelllinie	79
3.2.3	Eine Behandlung mit BFA führt zur Anhäufung von unprozessiertem Reporterprotein in der ACP ^{BTS} Wildtyp Zelllinie, nicht aber in der BFA-resistenten ACP ^{BTS_BFAR} Zelllinie .	82
3.2.4	Eine Behandlung mit BFA verzögert die Prozessierung des Reporterproteins der ACP ^{BTS} Wildtyp Zelllinie, nicht aber der BFA- resistenten ACP ^{BTS_BFAR} Zelllinie.	84
4	Diskussion	88
4.1	C-terminale ER <i>retrieval</i> Sequenzen haben einen negativen Einfluss auf den Transport eines Reporterproteins zum Apicoplasten von <i>P. falciparum</i>	89
4.2	Brefeldin A hat einen negativen Einfluss auf den Proteintransport zum Apicoplasten von <i>P. falciparum</i>	93
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick	96
5	Literaturverzeichnis	98
V	Anhang	viii
	Danksagung	
	Erklärung	

II Abkürzungen

ACP	<i>acyl carrier protein</i>
BFA	Brefeldin A
BTS	<i>bipartite topogenic signal</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
H	Stunde
Hsp	<i>heat shock protein</i>
IP	Immunpräzipitation
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L	Liter
M	Molar
mA	Milliampere
Mb	Megabasenpaare
Mg	Milligramm
Min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikromolar
Nm	Nanomolar
Pg	Pikogramm
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PV	parasitophore Vakuole
PVM	parasitophore Vakuolenmembran
Rpm	Umdrehungen pro Minute
SP	Signalpeptid
spp.	<i>species pluralis</i>
TP	Transitpeptid
V	Volt

III Zusammenfassung

Wie die meisten apicomplexen Parasiten besitzt *Plasmodium falciparum* eine komplexe von vier Membranen umschlossene Plastide sekundär endosymbiotischen Ursprungs, die als Apicoplast bezeichnet wird. Obwohl nicht länger photosynthetisch aktiv, ist der Apicoplast ein Zentrum metabolischer Aktivität und gilt aufgrund seiner für den Parasiten essentiellen Stoffwechselwege als vielversprechende Angriffsfläche neuer anti-Malaria Medikamente. Die meisten Apicoplast Proteine sind jedoch Zellkern-kodiert und müssen daher post-translational in die Plastide importiert werden, was die Etablierung entsprechender Signale und Transportmechanismen voraussetzt. Die Signale, welche die zunächst co-translationale Insertion von Apicoplast Proteinen ins ER und den anschließenden Transport zur Plastide vermitteln, wurden wie die molekularen Komponenten, die an der Translokation über die drei inneren Membranen beteiligt sind, in den letzten Jahren eingehend untersucht. Weitestgehend unbekannt ist, wie Apicoplast Proteine zunächst vom ER zur äußeren Apicoplasten Membran gelangen. In der gegenwärtigen Literatur wird ein Modell favorisiert bei dem Apicoplast Proteine bereits im ER erkannt und in ein spezielles vesikuläres System sortiert werden, über das sie unter Ausschluss des Golgi-Apparates auf direktem Weg vom ER zur äußeren Apicoplasten Membran transportiert werden.

Diese Arbeit liefert Hinweise, dass lösliche Apicoplast Proteine über eine Passage durch den Golgi-Apparat zum Apicoplasten transportiert werden. Anhand von ER *retrieval* Sequenzen, welche im Golgi erkannt werden, kann der Transport eines löslichen Apicoplast-gerichteten Reporterproteins nachhaltig beeinträchtigt werden. Desweiteren wird der Transport löslicher Apicoplast-gerichteter Reporterproteine unter Einfluss von Brefeldin A, einem bekannten Inhibitor des Golgi/ER vesikulären Systems, in einer *P. falciparum* Wildtyp Parasitenlinie weitestgehend inhibiert, während vor dem Hintergrund einer BFA-resistenten *P. falciparum* Zelllinie keine Beeinträchtigung des Transports zum Apicoplasten erfolgt. Entgegen der gegenwärtigen Literatur wird ein Modell vorgeschlagen, bei dem lösliche Apicoplast Proteine nach ihrer co-translationalen Insertion ins ER zunächst entlang des sekretorischen Weges transportiert werden. Im Golgi-Apparat werden sie dann, vermutlich von einem Golgi-residenten Transitpeptid Rezeptor, erkannt und über ein vesikuläres Transportsystem zur äußeren Apicoplasten Membran sortiert und transportiert.

IV Summary

Like most other apicomplexan parasites *Plasmodium falciparum* harbours a complex, four-membrane-bound plastid termed the apicoplast that has been acquired through a secondary endosymbiosis event. Although no longer photosynthetically active, the apicoplast is the site of essential biochemical pathways and therefore considered a potential drug target for the next generation of anti-malarials. However, due to its endosymbiotic origin, most genes encoding apicoplast proteins have been transferred to the parasite nucleus during the course of evolution and therefore are in need of signals and transport mechanisms that facilitate post-translational re-import of their products to the complex plastid. Whilst signals mediating co-translational insertion into the ER and further transport to plastid, as well as components facilitating the protein translocation across the three inner membranes of the apicoplast have been studied in detail during the last years, it remains largely unknown how proteins are initially trafficked from the ER to the outermost apicoplast membrane. Most models favour a direct ER to apicoplast trafficking route, in which proteins destined for the apicoplast are recognised in the ER and diverted to a specialised vesicular system that carries them to the outer apicoplast membrane thereby bypassing the Golgi-compartment.

This work provides substantial evidence that soluble proteins *en route* to the apicoplast indeed travel through the Golgi-compartment before reaching their final destination. By using ER retrieval sequences as Golgi-specific recognition signals we find that upon addition to an apicoplast-targeted reporterprotein, transport of this protein to the apicoplast is significantly impaired. Furthermore, trafficking of a soluble apicoplast-targeted reporterprotein can be substantially inhibited by brefeldin A, a fungal metabolite known to interfere with vesicle transport at the Golgi/ER interface, in a *P. falciparum* wildtype strain, whereas in a BFA-resistant *P. falciparum* strain transport is not affected. We propose that, upon co-translational insertion into the ER, soluble apicoplast proteins initially follow the default secretory pathway. In the Golgi they are then recognised, most likely by a putative transitpeptide receptor, and diverted to a vesicular system that directs them to the outer apicoplast membrane.

1 Einleitung

Der Parasit: "Ein tierisches oder pflanzliches Lebewesen, das aus dem Zusammenleben mit anderen Lebewesen einseitig Nutzen zieht, die es oft auch schädigt und bei denen es Krankheiten hervorrufen kann". (Definition Parasit (Biologie) nach Duden 2013).

Der Parasitismus stellt eine eigene Lebensform dar und ist weltweit von ökonomischer, ökologischer und gesundheitspolitischer Relevanz. Im Tierreich ist die parasitische Lebensweise weit verbreitet und findet in nahezu jeder größeren systematischen Einheit ihre Vertreter. Neben parasitär lebenden Würmern und den sogenannten Ektoparasiten, wie Läuse, Flöhe oder Milben, sind insbesondere parasitische eukaryotische Einzeller von enormer veterinär- und humanmedizinischer Bedeutung.

1.1 Apicomplexa

Der Stamm der Apicomplexa (Levine et al., 1980) ist die einzige größere taxonomische Gruppe, deren bekannte Mitglieder alle obligat parasitisch leben, und deshalb von besonderem Interesse für die Parasitologie. Zu den Apicomplexa zählt ein großes Sortiment an einzelligen eukaryotischen Organismen, die sowohl Vertebraten als auch Invertebraten parasitieren (Gubbels and Duraisingh, 2012). Unter ihnen existieren eine Vielzahl von morphologischen Erscheinungsbildern, abhängig von Gattung und Phase des Lebenszyklus. Die Apicomplexa sind von äußerst umfangreicher Artenvielfalt. Es wird angenommen, dass von geschätzten 1,2 - 10 Millionen existierenden Arten bislang nur etwa 0,1 % beschrieben und benannt wurden (Adl et al., 2007). Die meisten Apicomplexa gelten als moderat wirtsspezifisch und finden sich in breit gefächerten terrestrischen und marinen Lebensräumen, abhängig von der jeweiligen ökologischen Nische ihrer Wirtsorganismen. Es wird jedoch angenommen, dass für jede bekannte Tierart zumindest ein spezifischer Parasit unter den Apicomplexa existiert (Morrison, 2009). Namensgebend ist ein Satz charakteristischer sekretorischer Organellen am apikalen Ende der Parasiten, die den sogenannten Apikalkomplex bilden, und für das Eindringen des parasitischen Einzellers in seine Wirtszelle benötigt werden. Ein weiteres Charakteristikum der meisten Apicomplexa ist eine nicht-photosynthetische Plastide, die von mehreren Membranen umschlossen ist, der sogenannte Apicoplast (Gubbels and Duraisingh, 2012). Alle Apicomplexa haben einen komplexen Lebenszyklus, der einen oder mehrere Wirtsorganismen miteinschließt und über eine Reihe von geschlechtlichen und ungeschlechtlichen Vermehrungsphasen stattfindet. In der Regel sind alle Entwicklungsstadien, mit Ausnahme der diploiden Zygote, haploid. Einige Apicomplexa können Oozysten ausbilden, während andere strikt innerhalb eines

Wirtsorganismus propagieren (Beck et al., 2009a). Unter den Apicomplexa finden sich viele Parasiten, die teils schwere Krankheiten bei Mensch und Tier verursachen. Malaria und Toxoplasmose sind die bedeutendsten durch apicomplexe Parasiten verursachten Krankheiten des Menschen, während Babesiose, Theileriose und Coccidiose gängige Probleme der Viehwirtschaft sind.

1.1.2 Klassifizierung und phylogenetischer Ursprung der Apicomplexa

Formell werden die Apicomplexa in vier obligat parasitische Klassen unterteilt: Coccidien, Gregarinen, Hemosporidien und Piroplasmoriden. Diese Klassifizierung beruht hauptsächlich auf unterschiedlichen phänotypischen Charakteristika, wie Anzahl und Art der Wirte, Beschaffenheit des infizierten Gewebes, oder Besonderheiten im Lebenszyklus, und repräsentiert weniger die evolutionäre Verwandtschaft der Klassen untereinander (Morrison, 2009). Zu den Gregarinen zählen Parasiten, die ausschließlich in Invertebraten vorkommen, wobei nur ein kleiner Teil dieser Arten mittels moderner Methoden genauer charakterisiert worden ist. Innerhalb der Klasse Coccidia sind unter anderem die Gattungen *Toxoplasma*, *Eimeria* und *Neospora* vertreten, die intrazellulär im Magen-Darm-Trakt höherer Tieren leben, und in der Regel über oral-infektiöse Stadien im Kot übertragen werden. Die Hemosporidien, mit Gattungen wie *Plasmodium*, und die Piroplasmoriden, mit den Gattungen *Babesia* und *Theileria*, werden als Hematozoa zusammengefasst. Diese zeichnen sich durch einen obligaten Wirtswechsel zwischen blutsaugenden Arthropoden und Wirbeltieren aus. Darüber hinaus gibt es weitere Gattungen, die eigenständige Klasse bilden, wie *Cryptosporidium*, oder deren Klassifizierung derzeit nicht eindeutig geklärt ist, wie *Nephromyces* (Adl et al., 2005; Adl et al., 2012). Bislang gibt es keine fossilen Funde von Apicomplexen, aber aufgrund molekularer Daten wird angenommen, dass sie vor ca. 600 - 800 Millionen Jahren entstanden sind (Douzery et al., 2004).

Die phylogenetische Klassifizierung der Apicomplexa basiert hauptsächlich auf der Sequenzierung des Apicoplasten, der komplexen nicht-photosynthetischen Plastide von *Plasmodium falciparum* (Wilson et al., 1996). Anschließend phylogenetische Rekonstruktionen, führten zu der Annahme, dass eine enge Verwandtschaft zwischen Apicomplexa und photosynthetischen Organismen besteht (McFadden, 2000).

Entsprechend der Endosymbiontentheorie (Margulis, 1971; Mereschkowski, 1905; Sagan, 1967) sind primäre Plastiden und Mitochondrien das Ergebnis der Endosymbiose eines Prokaryoten in eine eukaryotische Wirtszelle, und anschließender Reduktion des Symbionten zum Organell. Heutzutage ist allgemein anerkannt, dass Mitochondrien von einem endosymbiotisch aufgenommenen α -Proteobakterium abstammen, während primäre

Plastiden auf die Endosymbiose eines photosynthetischen Cyanobakteriums in eine eukaryotische Wirtszelle zurückzuführen sind. Diese umfassen die Chloroplasten der Glaucophyta, Chlorophyta (Grünalgen) und Rhodophyta (Rotalgen). Im Gegensatz zu primären Plastiden der Pflanzen, sind komplexe Plastiden, die von mehr als zwei Membranen umschlossen sind, das Ergebnis einer sogenannten sekundären Endosymbiose - der Endosymbiose eines eukaryotischen Einzellers mit einem anderen eukaryotischen Einzeller, der bereits ein primäre Plastide enthielt (Gould et al., 2008). Im so entstandenen Eukaryot-Eukaryot Chimära wurde im Laufe der Evolution der einstige Symbiont schließlich zu einem Organell reduziert, das uneingeschränkt von seiner Wirtszelle abhängig ist (Cavalier-Smith, 2003; Gould et al., 2008; Green, 2011). Es existieren mehrere Typen von sekundären Plastiden, die in einem breiten Spektrum von Algen und Protisten vorkommen, und die aufgrund ihres Ursprungs von einer einst endosymbiotisch aufgenommenen Grün- bzw. Rotalge, aber auch aufgrund des Ausmaßes an Reduktion des einstigen Endosymbionten innerhalb der Wirtszelle, voneinander unterschieden werden können (Archibald, 2009; Gould et al., 2008; Keeling, 2010, 2013). Im Falle der Apicomplexa konnte die Abstammung der komplexen Plastide von einer ehemals endosymbiotisch aufgenommenen Rotalge mit der Entdeckung von *Chromera velia* (Moore et al., 2008) und anschließenden phylogenetischen Rekonstruktionen (Janouskovec et al., 2010) eindeutig geklärt werden. Phylogenetische Analysen zeigen, dass *Chromera*, Dinoflagellaten und Apicomplexa von einem gemeinsamen photosynthetischen Vorläufer abstammen, der eine Rotalge endosymbiotisch aufgenommen und zur Plastide reduziert hat. *Chromera velia* ist der engste bekannte photosynthetische Verwandte der Apicomplexa, und stellt im Hinblick auf die Evolutionsgeschichte vermutlich den Übergang von autotrophen Symbionten zu Parasiten dar (Janouskovec et al., 2010; Moore et al., 2008; Oborník et al., 2009; Oborník et al., 2011). Was aus dem bislang offengelegten evolutionären Szenario klar hervorgeht ist, dass die Apicomplexa weder als "Tiere mit einer Plastide", noch als "parasitische Pflanzen" bezeichnet werden können, sondern viel mehr eine einzigartige Evolutionsgeschichte aufweisen, die vermutlich zu einigen ihrer einzigartigen biologischen Charakteristika führte (Goodman and McFadden, 2012).

Entsprechend einer Theorie von Tom Cavalier-Smith hat die sekundäre Endosymbiose einer Rotalge in eine heterotrophe eukaryotische Wirtszelle nur einmal im Laufe der Evolutionsgeschichte stattgefunden, und bildet den gemeinsamen Ursprung einer Vielzahl von Organismen mit komplexen Plastiden, die als Chromalveolaten zusammengefasst werden (Cavalier-Smith, 1999). Diese "rote Linie" umfasst ein ganzes Konsortium von enorm unterschiedlichen Organismen, die von einzelligen photosynthetischen Organismen, über Parasiten, bis hin zu komplexen mehrzelligen Algen reichen. Aufgrund der Sequenzanalysen der komplexen Plastide von *P. falciparum*, wurden die Apicomplexa zusammen mit den 5

weiteren Hauptgruppen der Chromalveolaten: Heterokontophyten, Haptophyten, Cryptophyten, Ciliaten und Dinoflagellaten als von gemeinsamem und monophyletischem Ursprung zusammengefasst (Adl et al., 2005; Cavalier-Smith, 1999; Keeling, 2009, 2010). Das Paradigma eines monophyletischen Ursprungs aller Chromalveolaten wird jedoch kontrovers diskutiert, und weicht zunehmend Theorien über einen komplexeren Ursprung einiger zugeordneter Linien, wie tertiäre Endosymbiosen oder mehrere sekundär-endosymbiotische Ereignisse in Folge (Burki et al., 2012; Felsner et al., 2011; Kim and Graham, 2008; Moustafa et al., 2009; Woehle et al., 2011). Obwohl der Begriff Chromalveolata nach wie vor für die evolutionäre Abstammung von einer sekundär endosymbiotisch aufgenommenen Rotalge steht, wird er als taxonomischer Begriff mittlerweile nicht mehr verwendet (Adl et al., 2012; Keeling, 2013).

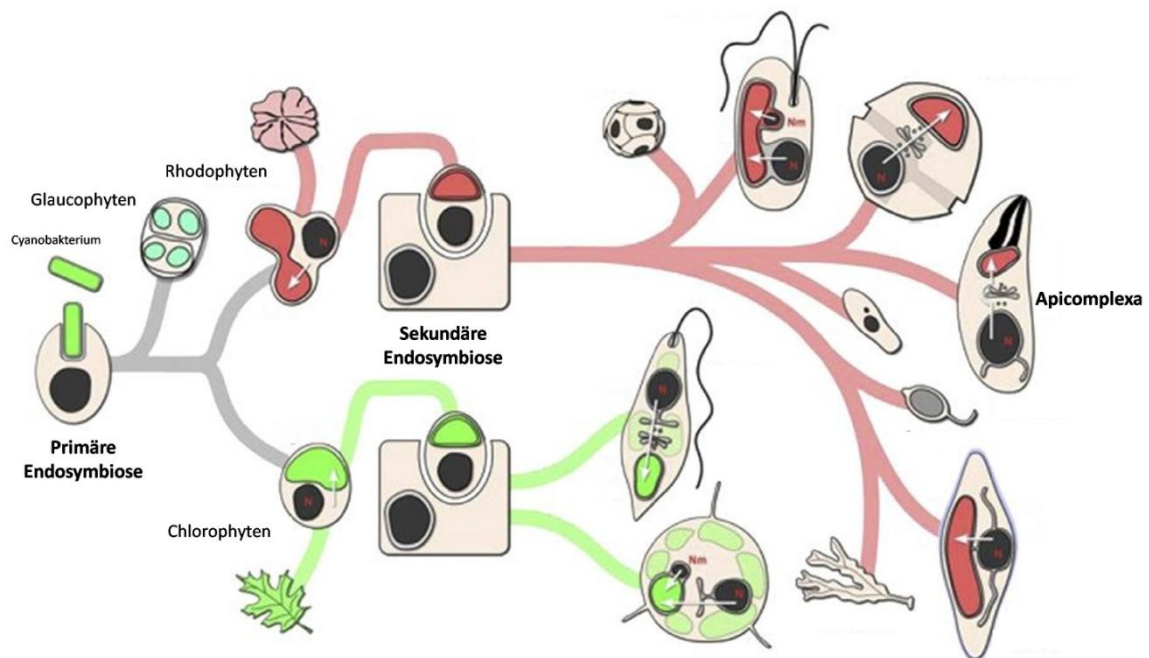


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Evolution komplexer Plastiden

[modifiziert von (Sheiner and Striepen, 2013)]

Die primäre Endosymbiose eines Cyanobakteriums bildet den Ursprung der primären Plastiden von Glaucophyten, Rhodophyten (Rotalgen) und Chlorophyten (Grünalgen). Mindestens zwei von einander unabhängige sekundäre Endosymbiosen einer Grünalge in eine heterotrophe eukaryotische Wirtszelle bilden den Ursprung der komplexen Plastiden der "grünen Linie". Die sekundäre Endosymbiose einer Rotalge in eine heterotrophe eukaryotische Wirtszelle bildet den Ursprung der komplexen Plastiden der "roten Linie", einschließlich der Apicomplexa.

Nach dem gegenwärtigen Konsensus werden die Eukaryoten in 6 Übergruppen aufgeteilt, unter welchen die Apicomplexa der SAR (Stramenophile, Alveolata, Rhizaria) Übergruppe zugeordnet sind. Innerhalb dieser Übergruppe werden sie gemeinsam mit den Protalveolaten (einschließlich *Chromera velia*), Dinoflagellaten und Ciliaten als Alveolaten zusammengefasst (Adl et al., 2012).

1.1.3 Veterinär- und humanmedizinische Relevanz der Apicomplexa

Bis heute sind etwa 6.000 apicomplexe Parasiten bekannt, wobei davon ausgegangen wird, dass diese nur einen geringen Teil der tatsächlich existierenden Arten repräsentieren (Adl et al., 2007). Nicht nur hinsichtlich ihrer Artenvielfalt stellen die Apikomplexa eine bedeutungsvolle Parasitengruppe dar, sie beherbergen außerdem Gattungen, die von enormer human- und veterinärmedizinischer Bedeutung sind.

Die durch *Eimeria* spp. verursachte Coccidiose von Geflügel, deren Symptomatik von Gewichtsverlust, über schlimme Durchfall Erkrankung, bis hin zum Tode reichen kann, ist für einen geschätzten jährlichen Gesamtverlust von 800 Millionen US Dollar in der Geflügelindustrie verantwortlich (Sharman et al., 2010). Eine Infektion mit *Neospora caninum*, die zur klinischen Krankheit bei Hunden führt, ist die Hauptursache für Fehlgeburten bei Rindern, die den Erreger über infizierten Hundekot aufgenommen haben (Dubey and Schares, 2011). Die Folgen sind jährlich geschätzte 800 Millionen US Dollar Verlust in der Milchindustrie, und bis zu 400 Millionen US Dollar Verlust in der Fleischindustrie (Reichel et al., 2013). Eine durch Zecken übertragene Infektion mit *Theileria parva* verursacht *East Coast* Fieber bei Rindern, das vorwiegend in den tropischen Regionen endemisch ist, und eine Mortalitätsrate von bis zu 90% bei nicht heimischen Rindern zur Folge haben kann (Gachohi et al., 2012). Pro Jahr sterben 1,1 Millionen Rinder an einer Infektion mit *Theileria parva* und verursachen damit einen wirtschaftlichen Schaden von 170 Millionen US Dollar (Muraguri et al., 1999). Die durch *Babesia* spp. verursachte Babesiose, die hauptsächlich bei Rindern von ökonomischer Bedeutung ist, hat in jüngster Zeit als stark aufkommende Zoonose großes Interesse auf sich gezogen. Eine Infektion des Menschen kann, je nach Immunstatus des Patienten, in ihrer Manifestation von symptomlos bis hin zu lebensbedrohlich variieren. Vor allem bei Neugeborenen und älteren Patienten kann eine Infektion durchaus tödlich verlaufen (Gray et al., 2010; Schnittger et al., 2012). Die Übertragung erfolgt durch Zecken; es wurde jedoch auch schon von Fällen berichtet, bei denen eine Infektion über Blutkonserven erfolgte (Leiby, 2011). *Toxoplasma gondii* ist der am weitesten verbreitete Parasit weltweit; es wird angenommen, dass bis zu 30% der Weltbevölkerung infiziert ist. Eine Infektion erfolgt über Oozysten, die mit dem Kot infizierter Katzen ausgeschieden werden (Grigg and Sundar, 2009). Die Toxoplasmose verläuft meist symptomlos, kann aber bei immunsupprimierten Patienten grippeähnlichen Erscheinungen auslösen. Eine Erstinfektion während der Schwangerschaft hingegen, kann zu erheblichen neurologischen Komplikationen, bis hin zu starken Missbildungen des Ungeborenen führen (Saadatnia and Golkar, 2012). Die bedeutendsten Vertreter der Apikomplexa gehören jedoch zweifellos zur Gattung *Plasmodium*, den Erregern der Malaria, welche bis heute die gefährlichste Parasitose der Menschheit darstellt.

1.2 Die Malaria und ihre Erreger *Plasmodium* spp.

Die Malaria ist die gefährlichste Parasitose der Welt und zählt zu den bedeutendsten Infektionskrankheiten der Menschheit. Ausgelöst wird diese Erkrankung durch eine Infektion mit apicomplexen Parasiten der Gattung *Plasmodium*. Es sind über 200 Plasmodien Arten bekannt, die eine Vielzahl von Vögeln, Reptilien und Säugetieren, insbesondere Nagetiere und Primaten, parasitieren (Perkins and Austin, 2009). Bislang gelten 5 davon als humanpathogen: *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium falciparum*, und seit kurzem auch *Plasmodium knowlesi*, ursprünglich ein Malariaerreger bei Makakken (Cox-Singh et al., 2008). Diese Erreger verursachen verschiedene Formen der Malaria beim Menschen, wobei die einer Infektion mit *Plasmodium falciparum* zugrunde liegende Malaria tropica die schwerwiegendste Malariaerkrankung darstellt. Eine Übertragung humanpathogener Plasmodien erfolgt ausschließlich durch weibliche Stechmücken der Gattung *Anopheles*, während andere Arten auch von *Culex* (Vögel) und *Aedes* (Reptilien) übertragen werden können.

1.2.1 Malaria - Epidemiologie, Relevanz und Kontrolle

Bis heute stellt die Malaria eines der größten weltgesundheitspolitischen Probleme dar. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation sterben jährlich ca. 650.000 Menschen an der Folge einer Malariaerkrankung, bis zu 80% davon sind Kinder unter 5 Jahren (World Health Organization., 2011). Die Endemiegebiete der Malaria erstrecken sich heutzutage hauptsächlich über tropische und subtropische Regionen, in denen die warmen Temperaturen und die hohe Luftfeuchtigkeit die Entwicklung der *Anopheles* Überträger begünstigen. Etwa 90% aller Malariabedingten Todesfälle weltweit betreffen alleine den afrikanischen Kontinent (World Health Organization., 2011). Die dort vorherrschend ärmlichen Wohnverhältnisse erschweren gängige Standardmaßnahmen zur Infektionsprävention. Zudem besteht für die Betroffenen meist nur ein limitierter oder gar kein Zugriff auf medikamentöse Behandlung, weshalb die Malaria auch oft als "Armutskrankheit" bezeichnet wird (Ricci, 2012; Sachs and Malaney, 2002).

Die typischen Symptome einer Malariaerkrankung sind plötzlich auftretendes hohes Fieber, das bei einigen, zumeist milden Formen der Malaria rhythmisch verläuft (Malaria quartana, Malaria tertiana), begleitet von Schüttelfrost, Schweißausbrüchen und starken Kopf- und Gliederschmerzen. Bei der schweren Malaria tropica tritt das Fieber nicht in regelmäßigen Schüben auf, so dass sie aufgrund der grippeähnlichen Symptome häufig zu spät erkannt und behandelt wird. Die Folgen einer Malaria tropica reichen von Anämien, über starke

neurologische Komplikationen, bis hin zu schweren Organschäden, und können vor allem bei Kindern rasch zu Koma und Tod führen (Rogerson, 2010; Rowe et al., 2009).

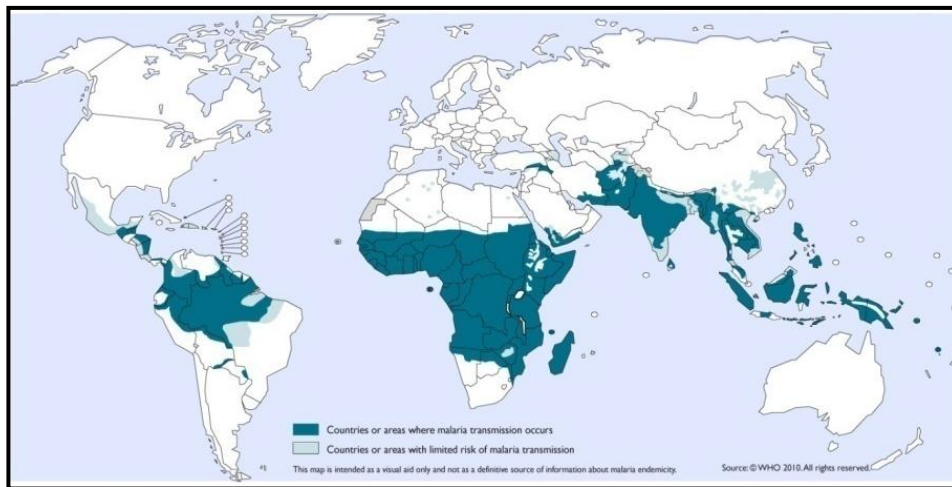


Abb. 1.2: Verbreitungsgebiete der Malaria (Stand 2009, World Health Organization, 2010).

Länder mit erhöhtem Malaria-Risiko und verstärkter Übertragung in dunkelblau. In hellblau, Länder mit eingeschränkter Malaria-Übertragung.

Eine medikamentöse Behandlung von Malaria Erkrankungen erfolgt zumeist mit Artemisinin-Derivaten, Arylaminoalkoholen oder Aminoquinolinen (Wells et al., 2009). Doch insbesondere *Plasmodium falciparum*, der Erreger der schweren Malaria tropica, kann sehr schnell und zunehmend Resistenzen gegenüber den eingesetzten Medikamenten ausbilden, was die Kontrolle der Krankheit erheblich erschwert (Dondorp et al., 2009; Garcia-Bustos and Gamo, 2013; Hayton and Su, 2008). Die Aminoquinoline, synthetische Derivate des aus Chinarinde gewonnenen Chinins, galten lange Zeit als die erfolgreichsten und vielversprechendsten Anti-Malaria Medikamente, mit limitierten Nebenwirkungen und darüberhinaus erschwinglichen Produktionskosten (Müller and Hyde, 2010). Anfang der 1960er Jahre wurde jedoch erstmals von Resistenzen von *P. falciparum* in der Thailändischen Grenzregion berichtet, die sich innerhalb weniger Jahrzehnte über nahezu sämtliche Endemiegebiete ausbreitete, so dass es heutzutage nur noch sehr wenige Regionen gibt, in denen eine monotherapeutische Behandlung mit Aminoquinolinen Wirkung zeigt (Garcia-Bustos and Gamo, 2013; Müller and Hyde, 2010; Wellems and Plowe, 2001). Resistenzen gegenüber anderen Chemotherapeutika entwickeln und verbreiten sich ähnlich rasant, so dass heutzutage vorwiegend Kombinationstherapien aus mehreren verschiedenen Wirkstoffen eingesetzt werden. Derzeit wird der größte Erfolg mit Kombinationen aus Artemisinin-Derivaten und anderen Wirkstoffen erzielt; es können jedoch bereits zunehmend Resistenzen von *P. falciparum* gegenüber Artemisinin-Derivaten beobachtet werden (Cheng et al., 2012; Dondorp et al., 2009; Eastman and Fidock, 2009; Fairhurst et al., 2012). Ein wirksamer Impfstoff steht derzeit nicht zu Verfügung. Seit den 1950er Jahren wurde zudem

im Rahmen verschiedener Programme versucht die Überträger der Malaria durch Insektizide auszurotten, was jedoch nur vorübergehende oder keine Erfolge erbrachte. Obwohl jedes Jahr viele Forschungsberichte über die Krankheit, den Parasiten und dessen Zellbiologie veröffentlicht werden, ist der messbare Fortschritt der Malariakontrolle begrenzt. Die größten Herausforderungen im Kampf gegen die Malaria bleiben nach wie vor die schnell und häufig auftretende Entwicklung von Resistenzen der Erreger gegenüber bestehenden Chemotherapeutika, und insbesondere das Fehlen eines Impfstoffes.

1.2.2 Der Lebenszyklus humanpathogener *Plasmodium* spp.

Der Lebenszyklus aller Plasmodien ist charakteristisch komplex und erfordert einen obligaten Wirtwechsel zwischen blutsaugenden Arthropoden und Wirbeltieren. Dabei werden, wie bei allen Apicomplexa, typischen Phasen der Entwicklung durchlaufen: Schizogonie (ungeschlechtliche Vermehrung), Gamogonie (Ausbildung der Geschlechtszellen) und Sporogonie (ungeschlechtliche Vermehrung und Ausbildung von infektiösen Stadien). Humanpathogene Plasmodien werden ausschließlich von weiblichen *Anopheles* Moskitos übertragen.

Die Infektion des Menschen erfolgt über den Stich eines infizierten *Anopheles* Moskitos, der während seiner Blutmahlzeit infektiöse Stadien, die Sporozoiten, über den Speichel in die Haut injiziert. Dabei sind für eine Infektion schon sehr wenige Sporozoiten ausreichend. Ausgehend von der Dermis dringen diese Sporozoiten aktiv in Blutgefäßen ein und werden über den Blutstrom innerhalb von Minuten zur Leber transportiert, wo sie vermutlich über Kupffer-Zellen in die Parenchymzellen der Leber eindringen, in denen sie sich je nach Art in 2 - 16 Tagen massiv vermehren (Prudêncio et al., 2006). Einige Plasmodien Arten, wie *P. ovale* und *P. vivax* können in diesem Stadium Ruheformen ausbilden, die für mehrere Monate bis Jahre als sogenannte Hypnozoiten in der Leber persistieren, und so zu Rückfällen einer bereits abgeheilten Krankheit führen können (Imwong et al., 2007; Markus, 2011). Innerhalb der Hepatozyten entwickeln sich die Sporozoiten zu reifen Leberschizonten, die mehrere tausend Merozoiten bilden, welche schließlich in sogenannten Merosomen in die Blutbahn abgegeben werden (Sturm et al., 2006). Die aus den Merosomen freigesetzten Merozoiten befallen in einer zweiten Phase der Infektion die Erythrozyten im Blut. In diesen findet eine weitere ungeschlechtliche Vermehrung durch Schizogonie statt.

Die Invasion der Erythrozyten erfolgt innerhalb weniger Sekunden über einen aktiven Penetrationsmechanismus, der dazu führt, dass die Parasiten innerhalb ihrer Wirtszelle von einer parasitophoren Vakuolen Membran (PVM) umschlossen bleiben (Cowman et al.,

2012). In der so gebildeten parasitophoren Vakuole (PV) werden während des intraerythrozytären Entwicklungszyklus drei morphologisch deutlich von einander zu unterscheidende Stadien durchlaufen. Ausgehend vom anfänglichen Ringstadium, in welchem die Parasiten nach Giemsa-Färbung als charakteristische Ringe zu erkennen sind, wird etwa 15 Stunden nach der Invasion das Stadium der höchsten Stoffwechsel- und Genaktivität erreicht, das sogenannte Trophozoitenstadium, während dessen der einzelne Parasit ein Vielfaches an Masse zunimmt, und das je nach Plasmodien Art mehr oder weniger ausgeprägte Veränderungen der Wirtszelle zur Folge hat. Schließlich reifen die Trophozoiten zu Schizonten heran, in denen durch mehrfache Kernteilungen bis zu 32 neue Merozoiten entstehen. Diese werden durch Lyse der Wirtszelle freigesetzt und können ihrerseits erneut Erythrozyten invadieren (Cowman and Crabb, 2006). Diese Vermehrung im Blut, die je nach Art ein bis drei Tage dauert, ist hauptsächlich für die Krankheitssymptome der Malaria. Die Entwicklung einzelner Parasiten findet in dieser Phase oft synchronisiert statt, sodass viele reife Blutschizonten gleichzeitig Merozoiten freisetzen. Die Lyse der Wirtszelle wird von der Ausschüttung toxischer Substanzen begleitet, was zur bekannten Periodizität der Malaria-typischen Fieberschübe führt (Wirth and Pradel, 2012). Diese Zeitintervalle betragen bei *P. ovale* und *P. vivax* ca. 48 Stunden (Malaria tertiana), während sich der Zeitabstand bei *P. malariae* auf ca. 72 Stunden beläuft (Malaria quartana). Bei *P. falciparum* hingegen verläuft das Wachstum der Blutstadien nicht synchronisiert, so dass das charakteristisch hohe Fieber nicht in Form regelmäßiger Intervalle auftritt (Malaria tropica).

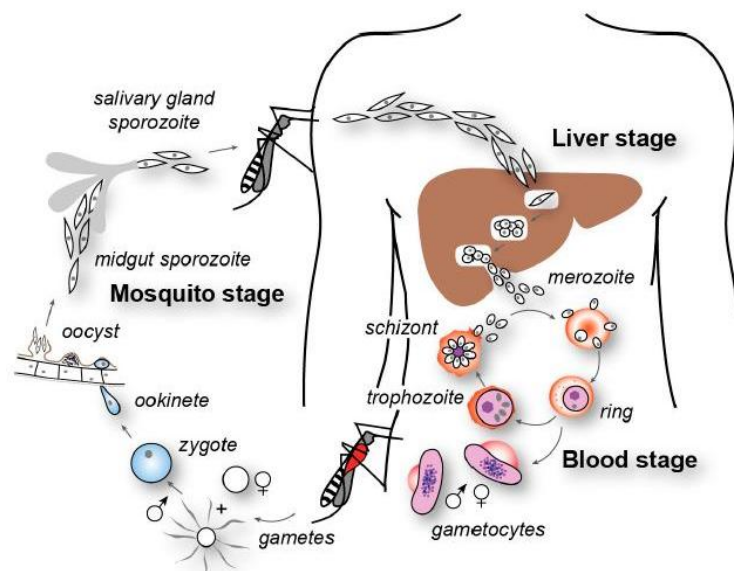


Abb. 1.3: Lebenszyklus humanpathogener *Plasmodium* spp. (Cowman et al., 2012).

Über den Stich eines infizierten *Anopheles* Moskitos werden infektiöse Sporozoiten auf den Menschen übertragen. Diese dringen in Leberzellen ein, vermehren sich dort, und werden anschließend als Merozoiten in die Blutbahn freigesetzt. Nach der Invasion eines Erythrozyten entwickeln sich die Parasiten von Ring- über Trophozoiten- zu Schizontenstadien. Durch die Lyse des Erythrozyten werden neue Merozoiten freigesetzt, die ihrerseits Erythrozyten befallen. Einige Parasiten entwickeln sich zu den sexuellen Gametocyten Stadien, die von einer blutsaugenden *Anopheles* Mücke aufgenommen werden. In deren Darm erfolgt die Ausbildung der diploiden Zygote. Nach dem Aufplatzen der Oozyste werden Sporozoiten freigesetzt, welche zur Speicheldrüse wandern und über einen Stich auf den Menschen übertragen werden können.

Einige Merozoiten entwickeln sich nach der Invasion eines Erythrozyten nicht bis zum Schizontenstadium, sondern differenzieren sich stattdessen über einen bislang unbekannten Mechanismus zu den Geschlechtsformen, d.h. zu männlichen Mikrogametozyten oder zu weibliche Makrogametozyten. Diese Gametozyten persistieren eine Zeitlang im Blut und können von einer blutsaugenden *Anopheles* Mücke aufgenommen werden, in deren Mitteldarm sie sich zu reifen Mikrogameten und Makrogameten entwickeln (Dixon et al., 2012; Kuehn and Pradel, 2010). Nach der Befruchtung eines weiblichen Makrogameten durch einen Mikrogameten entsteht eine diploide Zygote, die sich in einen mobilen Ookineten entwickelt, und in der Lage ist das Darmepithel des Moskito zu durchdringen (Angrisano et al., 2012). Zwischen Darmepithel und basaler Lamina entsteht eine Oozyste, in der durch Kernteilungen mehrere hundert Sporozoiten gebildet werden. Diese gelangen nach ihrer Freisetzung über die Hämolymphe der Mücke zu deren Speicheldrüsen, und können so über einen Stich auf den Menschen übertragen werden (Vlachou et al., 2006). Die Dauer des Entwicklungszyklus im Moskito ist abhängig von der Plasmodien Art sowie der Außentemperatur, und beträgt bei 20 - 28 °C etwa 8 - 14 Tage, wobei eine Mindesttemperatur von ca. 16 °C erforderlich ist.

1.3 *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum ist der Erreger der lebensgefährlichen Malaria tropica und wurde erstmals 1880 von Alphonse Laveran beschrieben (Cox, 2010). Die Weltgesundheitsorganisation schätzt, dass 90 % aller Malaria-bedingten Todesfälle auf eine Infektion mit *P. falciparum* zurückzuführen sind (World Health Organization., 2011). *P. falciparum* unterscheidet sich in einigen Merkmalen von den übrigen humanpathogenen Plasmodien Arten, was vermutlich mit dem schweren Krankheitsverlauf der Malaria tropica in Zusammenhang steht.

Die einzigartige Eigenschaft von *P. falciparum* ist die Fähigkeit zur Zytoadhärenz. Über Parasitenproteine, die an der Oberfläche des infizierten Erythrozyten präsentiert werden, können diese an Endothelwände der Blutgefäße binden, und somit einer Passage durch die Milz entgehen (Ockenhouse, 1993; Sharma, 1991). Eine weitere zytoadhäsive Eigenschaft von *P. falciparum* ist die Rosettenbildung infizierter Erythrozyten mit benachbarten nicht infizierten Erythrozyten (Carlson et al., 1994). Durch die Kombination von an Blutgefäßwänden haftenden infizierten Erythrozyten und Rosettenbildung, werden feine Kapillaren in lebenswichtigen Organen wie dem Gehirn blockiert, und damit deren Sauerstoffversorgung beeinträchtigt. Dies kann zu den schwerwiegenden neurologischen

Komplikationen der zerebralen Malaria führen und ist Hauptursache der schweren Symptomatik einer Malaria während der Schwangerschaft (plazentale Malaria) (Ndam and Deloron, 2007; Rowe et al., 2009). Das am besten untersuchte Zytoadhärenz-Protein ist das *Plasmodium falciparum* membrane protein 1 (PfEMP1) (Baruch et al., 1995), das von der hochvariablen *var*-Genfamilie an den subtelomeren Enden der Chromosomen kodiert wird, und das aufgrund seiner antigenen Variation außerdem eine zentrale Rolle bei der Immunevasion spielt (Pasternak and Dzikowski, 2009). Außer bei *P. falciparum* wurde die *var*-Genfamilie nur noch beim nahe verwandten Primaten-infizierenden *P. reichenowi* gefunden.

1.3.1 *Plasmodium falciparum* induzierte Veränderungen des infizierten Erythrozyten

Der komplexe Lebenszyklus von *P. falciparum* umfasst mehrere Entwicklungsstufen innerhalb des menschlichen Organismus, von denen jedoch hauptsächlich die erythrozytären Stadien für die schwerwiegende Symptomatik der Malaria tropica verantwortlich sind. Menschliche Erythrozyten sind höchst spezialisierte Zellen, deren vermutlich einzige Aufgabe im Sauerstoff- und Kohlendioxidtransport besteht. Während ihres Reifungsprozesses, der Erythropoese, wird sowohl der Zellkern ausgestoßen, als auch alle anderen Organellen abgebaut, so dass im reifen Erythrozyten weder Fett- noch Proteinbiosynthese stattfindet (Palis and Segel, 1998).

Die intra-erythrozytäre Lebensweise bietet *P. falciparum* entscheidende Vorteile hinsichtlich der Immunevasion, da der Parasit vor Immunglobulinen und Faktoren des Komplementsystems abgeschirmt ist, und der ausdifferenzierte Erythrozyt keine Fähigkeit zur Antigenpräsentation besitzt. Das in großen Mengen vorhandene Hämoglobin dient dabei als Nahrungsquelle, ist jedoch für das Überleben des Parasiten nicht ausreichend. Dies bedeutet, dass eine Reihe essentieller Nährstoffe aus dem extrazellulären Milieu bezogen werden muss, was die Etablierung von Transportwegen und - Maschinerien voraussetzt, deren molekulare Komponenten in der Wirtszelle nicht vorhanden sind. Desweiteren müssen Transportwege etabliert werden, die die Präsentation von Parasitenproteinen an der Oberfläche des Erythrozyten ermöglichen. Als Folge dessen gehen mit einer Infektion erhebliche, vom Parasiten induzierte "Umbauarbeiten" der an sich stark reduzierten Wirtszelle einher.

Die Invasion des Erythrozyten durch den *P. falciparum* Merozoiten erfolgt über einen Mechanismus der dazu führt, dass der Parasit von einer sogenannten parasitophoren Vakuolen Membran (PVM) umschlossen bleibt, die den Parasiten räumlich vom

Wirtszellzytosol abgrenzt (Bannister et al., 2000a; Lingelbach and Joiner, 1998). Der exakte Mechanismus wie die PVM gebildet wird ist unbekannt. Es wird jedoch angenommen, dass sie von der Plasmamembran des Erythrozyten abstammt, und durch einen Invaginationsprozess während der aktiven Invasion gebildet wird (Pouvelle et al., 1994; Ward et al., 1993). Oberflächenproteine des Erythrozyten konnten in der PVM lokalisiert werden (Bietz et al., 2009; Murphy et al., 2004), wobei eine spezifische Funktion dieser Proteine bislang jedoch nicht geklärt werden konnte. Hinsichtlich der Nahrungsaufnahme und des Proteintransports zwischen Parasit und Wirtszelle, stellt die PVM eine Hürde dar, die es zu überwinden gilt (Lingelbach and Przyborski, 2006).

Ausgehend von der PVM ziehen sich tubuläre Membranstrukturen durch das Zytosol der infizierten Wirtszelle, die als tubovesikuläres Netzwerk (TVN) bezeichnet werden (Elmendorf and Haldar, 1994; Hanssen et al., 2010b). Die Funktion dieses Exomembransystems ist derzeit noch nicht vollständig verstanden, es könnte jedoch als Speicher für Membran-Lipide dienen und eine Rolle beim Stofftransport spielen (Elford et al., 1995; Lauer et al., 1997).

Ein weiterer Bestandteil des vom Parasiten etablierten Exomembransystems innerhalb des Zytosols der Wirtszelle sind die sogenannten *Maurer's clefts* (MC), die erstmals 1902 von Georg Maurer beschrieben wurden (Lanzer et al., 2006). Die *Maurer's clefts* sind scheibenförmige Lamellen, von denen angenommen wird, dass sie aus der PVM hervorgehen. Mit Heranreifen des Parasiten dehnen sie sich zu einem weitläufigen und verworrenen Netzwerk aus, das über spezielle tubuläre Strukturen an die Plasmamembran des Erythrozyten angeheftet wird (Hanssen et al., 2010a; Pachlatko et al., 2010; Tilley et al., 2008). Die *Maurer's clefts* dienen als sekretorisches Zwischenorganell, in dem für die Wirtszelloberfläche bestimmte Pathogenitätsfaktoren, insbesondere PfEMP1, angereichert, und von dort aus weiter transportiert werden (Bhattacharjee et al., 2008; Kriek et al., 2003; McMillan et al., 2013; Wickham et al., 2001).

Neben den MC und dem TVN, gibt es noch weitere, weniger gut beschriebene Strukturen im Zytosol der Wirtszelle, die vermutlich am Export von Parasitenproteinen beteiligt sind, wie *electron dense vesicles* (EDV) (Trelka et al., 2000), *vesicle-like structures* (VLS) (Bannister et al., 2004) und J-dots (Külzer et al., 2012; Külzer et al., 2010).

Die auffälligste Veränderung des *P. falciparum* infizierten Erythrozyten ist die Ausbildung einer unregelmäßigen Form, deren Oberfläche mit Bereichen veränderter Struktur und hoher Elektronendichte, den sogenannten knobs, bedeckt ist (Trager et al., 1966). Diese knobs bilden die Plattform für die Präsentation des Pathogenitätsfaktor PfEMP1 und werden hauptsächlich von unter der Erythrozyten-Plasmamembran assemblierten *knob associated histidine-rich Protein* (KAHRP) (Taylor et al., 1987) gebildet (Maier et al., 2009). Die Deletion

von *kahrp* resultiert in knob-freien infizierten Erythrozyten und hat eine reduzierte Präsentation von PfEMP1 an der Oberfläche dieser Zellen zur Folge (Crabb et al., 1997; Horrocks et al., 2005).

Mit Heranreifen des Parasiten kann auch eine erhöhte Permeabilität der Wirtszelle für verschiedene niedermolekulare Stoffe beobachtet werden, die vermutlich auf die Induktion neuer Transportwege in der Plasmamembran des Erythrozyten zurückzuführen ist - den sogenannten *novel permeability pathways* (NPP) (Kirk and Saliba, 2007; Kirk et al., 1999; Staines et al., 2005). Bislang ungeklärt ist, ob diese NPP von reaktivierten oder veränderten endogenen Proteinen der Wirtszelle gebildet werden, oder vom Parasiten selbst synthetisiert und zur Erythrozyten Membran transportiert werden (Baumeister et al., 2011; Baumeister et al., 2006; Huber et al., 2002; Quashie et al., 2010; Winterberg et al., 2012).

1.3.2 Zellbiologie von *Plasmodium falciparum*

In Blutstadien enthält der Zellkern von *P. falciparum* ein haploides 23 Megabasenpaare großes Genom, das sich auf 14 Chromosomen verteilt, und für ungefähr 5.500 Proteine kodiert (Gardner et al., 2002). Bezeichnend ist der enorme AT-Gehalt der DNA von annähernd 80%, der im Vergleich zu anderen Organismen deutlich erhöht ist. An den subtelomeren Enden der Chromosomen finden sich verstärkt Genfamilien, die eine Rolle bei der antigenen Variabilität spielen, wie die *var*, *rifin*, oder *stevor* Genfamilien (Hernández-Rivas et al., 2013; Kirkman and Deitsch, 2012). Von allen vorhergesagten Genprodukten zeigen ungefähr 60% keine oder nur wenig Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen anderer Organismen, so dass ihnen bislang keine bestimmte Funktion zugeschrieben werden kann (Gardner et al., 2002).

Die Kernhülle steht in Kontinuum mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) des Parasiten (Aikawa, 1971; Bannister et al., 2004). Das ER umfasst diverse Markerproteine mit gut beschriebenen Funktionen in anderen Organismen, wie das zur Hsp70-Familie gehörende molekulare Chaperon PfBiP (Kumar et al., 1991), das Calcium-bindende Protein PfERC (La Greca et al., 1997) und verschiedene Untereinheiten des Sec61 Translokons (Couffin et al., 1998). Auch Komponenten der *ER-associated protein degradation* (ERAD) Qualitätskontrolle konnten *in silico* identifiziert und teilweise näher charakterisiert werden (Chung et al., 2012; Sommer et al., 2007; Spork et al., 2009). Bezeichnenderweise konnten im Genom von *P. falciparum* Kopien einiger ERAD Komponenten nachgewiesen werden, die für eine abgewandelte ERAD-Maschinerie kodieren, welche eine Rolle bei der Translokation von Proteinen in die komplexe Plastide spielt (Sommer et al., 2007; Spork et al., 2009); worauf in einem späteren Abschnitt noch genauer eingegangen wird.

Der Golgi-Apparat existiert in *P. falciparum* in reduzierter Form, ohne die klassische geschichtete Morphologie mit definierten *cis* und *trans* Bereichen, wie sie in höheren Eukaryoten zu finden ist. Verschiedene Golgi-assoziierte Proteine mit gut beschriebenen Funktionen in anderen Organismen, wie der KDEL-Rezeptor ERD2 (Elmendorf and Haldar, 1993), *Golgi-reassembly stacking proteins* GRASPs (Struck et al., 2005; Struck et al., 2008a), oder die GTPase Rab6 (de Castro et al., 1996; Van Wye et al., 1996) konnten jedoch definiert und separat lokalisiert werden, so dass eine biochemische und räumliche Organisation des Golgi in gewissem Maße vorhanden zu sein scheint (Adisa et al., 2007; Struck et al., 2008b).

P. falciparum besitzt ein einziges Mitochondrium, dessen stark reduziertes 6 Kilobasenpaare großes Genom für nur 3 Proteine kodiert (Vaidya and Mather, 2009). Alle weiteren mitochondrialen Proteine sind im Zellkern des Parasiten kodiert und müssen, nach ihrer Synthese an freien Ribosomen im Zytosol des Parasiten, post-translational importiert werden (Bender et al., 2003). Während der Entwicklung des Parasiten vergrößert sich das Mitochondrium zunehmend und bildet letztlich ein ausgeprägtes schlauchförmiges Netzwerk (van Dooren et al., 2005).

1.3.2.1 Einzigartige Kompartimente in *Plasmodium falciparum*

Der zellbiologische Aufbau von *P. falciparum* entspricht im Wesentlichen dem anderer eukaryotischer Zellen, und umfasst die gleichen Haupt-Organellen. Die Existenz konventioneller Peroxisomen, Organellen, die üblicherweise unter den Eukaryoten konserviert und am Stoffwechsel von Fettsäuren und anderen Verbindungen beteiligt sind, konnte bislang jedoch nicht nachgewiesen werden (McIntosh et al., 2005). Im Gegensatz dazu besitzt *P. falciparum* einige Kompartimente, die in anderen eukaryotischen Organismen nicht vorhanden sind, wie z.B. die Organellen des Apikalkomplex, die Nahrungsvakuole, oder die komplexe Plastide - der Apicoplast.

Eine Gemeinsamkeit aller apicomplexen Parasiten, und gleichzeitig ihr namengebendes Charakteristikum, ist ein Satz morphologisch und funktionell unterschiedlicher sekretorischer Organellen, die zusammengefasst als Apikalkomplex bezeichnet werden. Dieser Apikalkomplex spielt eine entscheidende Rolle bei der Invasion der Wirtszelle und setzt sich bei *P. falciparum* zusammen aus Rhoptrien, Micronemen und dichten Granula (Blackman and Bannister, 2001; Cowman et al., 2012). Die apikalen Organellen werden *de novo* im sich entwickelnden Merozoiten während des Schizontenstadiums synthetisiert (Bannister et al., 2000b; Margos et al., 2004). Die Micronemen sind verantwortlich für die erste Kontaktausbildung des Merozoiten mit der Oberfläche der Wirtszelle und die anschließende

Formation von *tight junctions*. Sie liefern außerdem die Zugkraft, die den Merozoiten während der Invasion in die Zelle treibt (Baum et al., 2006; Cowman and Crabb, 2006; Richard et al., 2010). Die Rhoptrien sind die größten dieser sekretorischer Organellen und ebenfalls beteiligt am irreversiblen Binden an die Wirtszelle und der Ausbildung von *tight junctions* während der Invasion (Cowman and Crabb, 2006; Hanssen et al., 2013). Es wird zudem angenommen, dass Rhoptrien-Proteine an der Formation der PV und an weiteren Veränderungen der Wirtszelle beteiligt sind (Lingelbach and Joiner, 1998). Über die Funktion der dichten Granula ist bislang nur wenig bekannt. Nachdem die Invasion beendet ist, werden von ihnen Proteine in die PV sezerniert, die vermutlich eine Rolle beim weiteren Proteintransport zwischen Parasit und Wirtszelle spielen (Mercier et al., 2005).

Die Nahrungsvakuole entsteht wahrscheinlich *de novo* in Ringstadien durch endozytotische Vesikel, die miteinander fusionieren (Abu Bakar et al., 2010). Über ein sogenanntes Cytostom, eine Struktur die in vielen frei-lebenden und parasitischen Protozoen zu finden ist (De Souza, 1995), nimmt der Parasit kleine Portionen des Wirtszellzytosols auf (Abu Bakar et al., 2010; Aikawa et al., 1966) und zersetzt das darin enthaltene Hämoglobin über ein Set von Proteasen innerhalb der Nahrungsvakuole zu kleinen Peptiden (Goldberg, 2005). Das abgebaute Hämoglobin dient dem Parasiten als Nahrungsquelle und gleichzeitig zur Erhaltung der osmotischen Stabilität der Wirtszelle (Francis et al., 1997; Lew et al., 2003; Rosenthal and Meshnick, 1996). Während seines ca. 48stündigen intra-erythrozytären Entwicklungszyklus verbraucht der Parasit so bis zu 65% des im Erythrozyten vorhandenen Hämoglobins (Krugliak et al., 2002). Ein Nebenprodukt des Hämoglobin Abbaus ist das toxische Häm, das zur kristallinen Form umgewandelt und als Hämozoin, oder Malariapigment, in der Nahrungsvakuole abgelagert wird (Goldberg et al., 1991; Pagola et al., 2000; Sullivan et al., 1996). Einige der bekanntesten anti-Malaria Medikamente, wie Chloroquin oder Chinin, reichern sich in der Nahrungsvakuole an und verhindern die Ausbildung von kristallinem Hämozoin, was zu einer Anhäufung von toxischem Häm und zum Absterben des Parasiten führt (Bray et al., 2005; Combrinck et al., 2013). Die häufig und schnell auftretenden Resistenzen von *P. falciparum* gegen diese Chemotherapeutika sind hauptsächlich mit Mutationen zweier kritischer Proteinen in der Nahrungsvakuole assoziiert; dem P-Glycoprotein Homolog PfMDR1 (Cowman et al., 1991) und dem *Chloroquine resistance transporter* PfCRT (Fidock et al., 2000).

Ein weiteres eigentümliches Organell, das die apicomplexen Parasiten auszeichnet, ist der Apicoplast. Die apicomplexe Plastide ist für das Leben des Parasiten essentiell und wird im Folgenden näher beschrieben.

1.4 Der Apicoplast - die apicomplexe Plastide

Der Apicoplast ist die komplexe nicht-photosynthetische Plastide der Apicomplexa und zählt zu deren biologisch einzigartigen Charakteristika. Der Apicoplast ist das Ergebnis eines einstigen sekundären Endsymbiose Ereignis, und als Folge dessen von 4 Membranen umschlossen. Ein kleines Plastiden-Genom ist bis heute erhalten, wobei die Mehrzahl aller Gene jedoch im Laufe der Evolution zum Zellkern des Parasiten transferiert wurde. Im Apicoplasten finden für den Parasiten essentielle Stoffwechselwege statt, weshalb die Plastide als vielversprechendes Ziel für die Medikamentenentwicklung angesehen wird.

1.4.1 Entdeckung und Ursprung des Apicoplasten

Eine Plastide in apicomplexen Parasiten wurde erstmals 1965 basierend auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *Eimeria* beschrieben (Scholtyseck and Piekarski, 1965). Nachdem einige Jahre später ein zirkuläres, extra-chromosomales DNA Molekül in *Plasmodium laphuræ* (Kilejian, 1975) und ähnliche Kreise in *Toxoplasma gondii* (Borst et al., 1984) entdeckt wurden, wurde jedoch zunächst angenommen, dass es sich hierbei um das Genom eines Mitochondriums handeln müsse (Gardner et al., 1988; Kilejian, 1975; Williamson et al., 1985). Erst als ein weiteres 6 kb lineares DNA Fragment entdeckt wurde, das klassische mitochondriale Gene kodiert (Suplick et al., 1988; Vaidya et al., 1989), rückte das zirkuläre DNA Molekül erneut in den Fokus des Interesse. Erste Sequenzdaten des zirkulären Genoms von *Plasmodium falciparum* bestätigten tatsächlich einen prokaryotischen Ursprung, jedoch nicht den erwarteten α -proteobakteriellen eines Mitochondriums. Stattdessen deuteten die Sequenzdaten auf eine Verwandtschaft zu Plastiden von Pflanzen und Algen hin (Gardner et al., 1993; Gardner et al., 1991a; Gardner et al., 1994; Gardner et al., 1991b). Die Sequenzierung des kompletten 35 kb Genoms zeigte schließlich eine Übereinstimmung mit Plastiden in nahezu jeder Einzelheit, bis auf die große und bezeichnende Ausnahme - das Fehlen jeglicher Gene, deren Produkte für die Fotosynthese notwendig sind (Wilson et al., 1996). *In situ* Hybridisierungen in *Toxoplasma gondii* bestätigten, dass das zirkuläre Genom nicht im Mitochondrium, sondern in einem anderen Organell liegt, welches anschließend als Plastide deklariert wurde (Köhler et al., 1997; McFadden et al., 1996). Diese Plastide ist heute bekannt als Apicoplast, von apicomplexer Plastide, und ist ein "Wahrzeichen" aller Apicomplexa, mit der Ausnahme von *Cryptosporidium* spp. (Xu et al., 2004; Zhu et al., 2000) und einigen Gregarinen (Toso and Omoto, 2007), von denen angenommen wird, dass sie die Plastide im Laufe der Evolution wieder verloren haben.

Anfänglich wurde der Apicoplast als Organell, umgeben von zwei oder mehr Membranen, beschrieben (McFadden et al., 1996), wobei die tatsächliche Anzahl der umgebenden Membranen jedoch längere Zeit unklar blieb (Hopkins et al., 1999; Köhler, 2005; Köhler et al., 1997). Inzwischen ist nahezu sichergestellt, dass es tatsächlich 4 Membranen sind, die den Apicoplasten umschließen (Lemgruber et al., 2013; McFadden, 2011). Wie bereits erwähnt, sind Plastiden mit mehr als zwei Membranen charakteristisch für eine sekundäre Endosymbiose (Gould et al., 2008). Es wurde längere Zeit kontrovers diskutiert, ob der Ursprung des Apicoplasten in einem einstigen Grünalgen- (Funes et al., 2002; Köhler et al., 1997) oder Rotalgen-Endosymbionten (Waller et al., 2003; Williamson et al., 1994; Wilson, 1993) liegt; was mit der Entdeckung von *Chromeria velia* und anschließenden phylogenetischen Rekonstruktionen geklärt werden konnte (Janouskovec et al., 2010; Moore et al., 2008). Der Apicoplast ist eine sekundäre Plastide die von einem photosynthetischen Eukaryoten abstammt. Ein gemeinsamer Vorfahre der Apicomplexa, Dinoflagellaten und Chromeriden hat eine Rotalge endosymbiotisch aufgenommen, und im Laufe der Zeit zur Plastide reduziert (Janouskovec et al., 2010; Moore et al., 2008; Oborník et al., 2009; Oborník et al., 2012; Oborník et al., 2011). Die offensichtlichsten Überbleibsel dieses Vorgangs sind die dritte und vierte Membran die den Apicoplasten umschließen, sowie der massive Gentransfer der meisten für die Apicoplast Funktionen essentiellen Gene ins Genom der Wirtszelle (Goodman and McFadden, 2012).

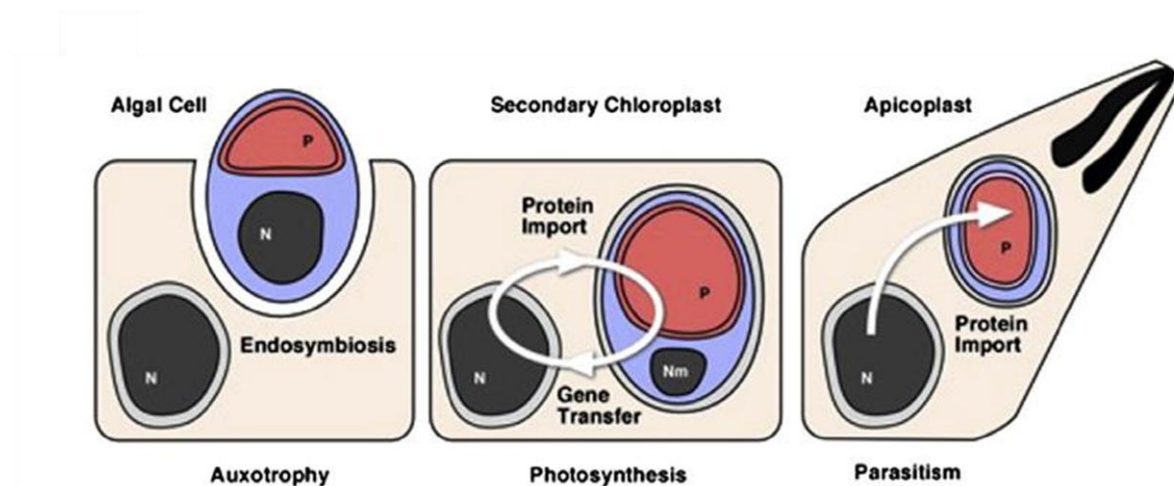


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Entstehung des Apicoplasten (Sheiner and Striepen, 2013).

Eine Rotalge (blau) mit ihrem Chloroplasten (rot) wird vom Endomembransystem einer eukaryotischen Wirtszelle umschlossen. Der Zellkern der Rotalge wird reduziert, begleitet von massivem Gentransfer zum Zellkern der Wirtszelle; gleichzeitig werden komplexe Protein Import Systeme in die Rotalge etabliert. Der Zellkern der ehemaligen Rotalge wird schließlich komplett reduziert; die Eigenschaft der Photosynthese geht verloren; der Apicoplast ist vom Import Zellkern-kodierter Proteine abhängig. Die Membranen des ehemaligen Chloroplasten bilden die beiden inneren Membranen, die ehemalige Plasmamembran der Rotalge bildet die zweitäußere Membran, die äußere Membran stammt vom Endomembransystem der ehemaligen Wirtszelle. N: Zellkern; P: Plastide.

1.4.2 Funktionen des Apicoplasten

Nach der Entdeckung des Apicoplasten war zunächst vollkommen unklar, welche Funktion dieser nicht-photosynthetischen Plastide in apicomplexen Parasiten zukommt. Eine pharmakologische oder gentechnische Manipulation des Apicoplasten führt zum Tod des Parasiten (Fichera and Roos, 1997; He et al., 2001), das kleine Genom selbst kodiert jedoch fast ausschließlich Produkte zum Zwecke der grundsätzlichen Selbsterhaltung, wie DNA Replikation, Transkription und Translation (Köhler et al., 1997; Wilson et al., 1996). Der Interessenfokus hat sich folglich auf Apicoplast Proteine gerichtet, die aufgrund des horizontalen Gentransfers im Zellkern des Parasiten kodiert sind. Bioinformatische Plattformen (Foth et al., 2003; Zuegge et al., 2001) ermöglichen die Vorhersage von Apicoplast Proteinen im Genom von *P. falciparum*, anhand derer bislang etwa 500 Gene identifiziert werden konnten, von deren Genprodukten angenommen wird, dass sie für den Apicoplasten bestimmt sind (Foth et al., 2003; Gardner et al., 2002; Ralph et al., 2004b).

Obwohl nicht länger photosynthetisch aktiv, ist der Apicoplast ein Zentrum metabolischer Aktivität. Stoffwechselwege, die im oder unter Beteiligung des Apicoplasten erfolgen, beinhalten die Biosynthese von Isoprenoid Vorläufern, Fettsäuren, Eisen-Schwefel-Clustern und Häm (Lim and McFadden, 2010; Ralph et al., 2004b; Seeber and Soldati-Favre, 2010). Aufgrund des prokaryotischen Ursprungs des Apicoplasten unterscheiden sich die molekularen Details dieser Synthesewege teilweise erheblich von den entsprechenden eukaryotischen Stoffwechselwegen, weshalb der Apicoplast als ein potentiell und vielversprechendes Ziel für die Medikamentenentwicklung gilt (Goodman and McFadden, 2012; MacRae et al., 2012).

Isoprenoide sind prosthetische Gruppen vieler Enzyme und dienen als Vorläufer für Ubiquinone und Dolichole, die eine Rolle im Elektronentransport spielen, bzw. an der post-translationalen Modifizierung von Proteinen beteiligt sind. Die Bausteine für Isoprenoid sind Isopentenylpyrophosphat (IPP) und sein Isomer Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP), welche in Bakterien über den 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphat (DOXP) Weg synthetisiert werden, während die Synthese in eukaryotischen Zellen üblicherweise über den Mevalonatweg erfolgt. Isoprenoid Vorläufer werden in *P. falciparum* ausschließlich im Apicoplasten über den prokaryotischen DOXP- Syntheseweg synthetisiert (Cassera et al., 2004; Jomaa et al., 1999; Ralph et al., 2004b). Dieser unterscheidet sich in wesentlichen Merkmalen vom Mevalonatweg der eukaryotischen Wirtszellen von *Plasmodium*, was DOXP zu einem idealen Ziel für die Medikamentenentwicklung macht. Tatsächlich konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass die Synthese von Isoprenoid Vorläufern offensichtlich die einzige essentielle Funktion des Apicoplasten im Blutstadium von *P. falciparum* darstellt (Yeh and DeRisi, 2011).

Die *de novo* Synthese von Fettsäuren im Apicoplasten von *P. falciparum* erfolgt über den prokaryotischen FASII Biosyntheseweg, der sich einigen Merkmalen vom eukaryotischen FASI Syntheseweg unterscheidet, und deshalb ebenfalls einen attraktiven Angriffspunkt für die Entwicklung neuer anti-Malaria Medikamente darstellt (Lim and McFadden, 2010; Ralph et al., 2004b; Surolia and Surolia, 2001). In Gametozyten und Blutstadien ist die Fettsäuresynthese für den Parasiten nicht überlebensnotwendig (Pei et al., 2010; Vaughan et al., 2009; Yu et al., 2008), es konnte jedoch gezeigt werden, dass sie für das Leberstadium von Nagetier-infizierenden *P. yoelli* essentiell ist (Pei et al., 2010; Vaughan et al., 2009).

Eisen-Schwefel-Cluster (Fe-S-Cluster) sind als Co-Faktoren von Enzymen an vielen biologischen Prozessen beteiligt. Der Bedarf der Zelle wird üblicherweise durch *de novo* Synthese in Mitochondrien gedeckt. Fe-S-Cluster sind auch in einigen Apicoplast Proteinen als integrale Co-Faktoren vorhanden (Ralph et al., 2004b), unter anderem in zwei an der Synthese von Isoprenoid Vorläufern beteiligten Enzymen (Röhrich et al., 2005). Das Apicoplast Proteom enthält außerdem Proteine, die an der Biosynthese von Fe-S-Clustern beteiligt sind; welche sowohl im Zellkern, als auch im Apicoplasten Genom selbst kodiert sind. Es wird deshalb angenommen, dass die Synthese von Fe-S-Clustern der Apicoplast Proteine direkt innerhalb der Plastide erfolgt (Ellis et al., 2001; Kumar et al., 2011; Lim and McFadden, 2010; Seeber, 2002).

Ähnlich wie Fe-S-Cluster finden sich Häme als prosthetische Gruppen an vielen Proteinen, wie den Globinen und Cytochromen. Häm b ist ein eisenhaltiger Farbstoff, der Teil des Hämoglobins ist. *P. falciparum* nutzt das im Blutstadium reichlich vorhandene Hämoglobin als Aminosäurequelle, indem es endozytotisch aufgenommen und zu kleinen Peptiden abgebaut wird (Kamchonwongpaisan et al., 1997; Kolakovich et al., 1997; Rosenthal and Meshnick, 1996). Das so freigesetzte Häm wird jedoch in der Nahrungsvakuole zu kristallinem Hämozoin polymerisiert (Sullivan et al., 1996), so dass der Parasit auf *de novo* Hämsynthesewege angewiesen ist; nicht zu letzt um den Bedarf an Häm in Entwicklungsstadien außerhalb der roten Blutkörperchen zu decken (Lim and McFadden, 2010). Die Häm Synthese in *P. falciparum* erfolgt über einen einzigartigen Hybridweg, indem der klassische eukaryotische Syntheseweg, der enzymatische Reaktionen in den Mitochondrien und im Zytoplasma umfasst, mit dem klassischen Syntheseweg der Plastiden von Pflanzen kombiniert wird. Die Häm Synthese in *P. falciparum* beinhaltet enzymatische Reaktionen im Apicoplasten, im Mitochondrium und im Zytoplasma, und erfordert einen ständigen Austausch der Organellen untereinander (2009a; Nagaraj et al., 2008; 2010a; 2010b; 2009b; Ralph et al., 2004b; Sato et al., 2004; van Dooren et al., 2006; Varadharajan et al., 2002).

Eine detaillierte Untersuchung der im Apicoplasten stattfindenden Synthesewege, und ihrer jeweilige Relevanz in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien von *P. falciparum*, könnte für die Entwicklung zukünftiger anti-Malaria Medikamente von enormer Bedeutung sein. Die Mehrzahl der an diesen Prozessen beteiligten Apicoplast Proteine ist jedoch im Zellkern des Parasiten kodiert und muss daher post-translational in die Plastide reimportiert werden. Dieser komplexe Vorgang ist ein (zunächst) sekretorischer Prozess und wird in den folgenden Kapiteln näher beschrieben.

1.5 Der sekretorische Weg

Eine Vielzahl von Proteinen, die innerhalb einer Zelle synthetisiert werden, müssen anschließend ins umgebende Medium ausgeschüttet werden. Solche Proteine werden in der Regel über Transportvesikel entlang des sekretorischen Weges zunächst vom ER zum Golgi-Apparat transportiert und vom Golgi ausgehend in weitere vesikuläre Transportsysteme sortiert, die anschließend mit der Plasmamembran fusionieren und ihre Cargo Proteine freisetzen. Auch Proteine, die in die Plasmamembran inserieren, ihren eigentlichen Bestimmungsort im Golgi-Apparat selbst oder im Lysosom/Endosom haben gelangen zunächst über den sekretorischen Weg vom ER zum Golgi-Apparat, und werden dort entsprechend erkannt und sortiert.

1.5.1 Der frühe sekretorische Weg

In fast allen eukaryotischen Organismen wird der Eintritt in den sekretorischen Weg von einer Signalsequenz am N-Terminus der Proteine vermittelt, die als Signalpeptid (SP) bezeichnet wird. Signalpeptide sind üblicherweise zwischen 15-30 Aminosäuren lang und besitzen einen hydrophoben Kern, der für die co-translationale Insertion sekretorischer Proteine ins ER essentiell ist (Blobel and Dobberstein, 1975a; von Heijne, 1985). Die an freien Ribosomen im Zytoplasma der Zelle translatierte Signalsequenz der wachsenden Polypeptidkette wird von einem *signal recognition particle* (SRP) erkannt und unter vorübergehendem Stop der Translation zur ER Membran dirigiert. Nach der Bindung von SRP an seinen Rezeptor in der ER Membran wird die Translation durch den Translokonformenden Sec61 Komplex fortgesetzt, und das Protein co-translational ins ER inseriert (Blobel and Dobberstein, 1975b; Johnson and van Waes, 1999; Keenan et al., 2001). In den meisten Fällen erfolgt daraufhin eine proteolytische Abspaltung des Signalpeptids im Inneren des ER (Blobel and Dobberstein, 1975a; Dalbey and Von Heijne, 1992). Durch eine Reihe von Chaperonen, Co-Chaperonen, Lektinen und anderen Enzymen wird die Ausbildung der

nativen Konformation der Proteine unterstützt, die meist von der Bildung von Disulfidbrücken begleitet wird (Ellgaard et al., 1999). Falsch gefaltete Proteine werden über Komponenten der *ER-associated protein degradation* (ERAD) Qualitätskontrolle ins Zytoplasma ausgeschleust und für einen Abbau im Proteasom markiert (Ellgaard and Helenius, 2003; Hoseki et al., 2010). Viele sekretorische Proteine werden zusätzlich durch die Anheftung von Kohlenhydraten glykosyliert, was zur Erkennung und korrekten Sortierung im weiteren Verlauf des sekretorischen Weges beiträgt (Helenius and Aebi, 2001).

Der anterograde Transport sekretorischer Proteine vom ER zum Golgi-Apparat erfolgt über COPII Vesikel. Durch das Zusammenspiel verschiedener Signale und Rezeptoren werden Cargo Proteine und COPII bildende *Coat* Proteine zur ER Membran rekrutiert, an welcher eine Assemblierung der *Coat* Proteine unter Beteiligung der kleinen GTPase Sar1 stattfindet (Barlowe, 2002; Dancourt and Barlowe, 2010). Die Abknospung von COPII Vesikeln erfolgt in der Regel an speziellen *ER exit sites* (Bannykh et al., 1996; Orci et al., 1991). Über SNARE und Rab Proteine werden die Vesikel zu ihrer korrekten Zielmembran dirigiert. Die Fusion mit der Zielmembran führt schließlich zur Freisetzung der Cargo Proteine (Jahn et al., 2003; McNew et al., 2000).

Ein COPI-abhängiger retrograder Transportweg vom Golgi zum ER recycelt Vesikel Proteine und Lipide, die für weitere Zyklen des anterograden Transports zwischen ER und Golgi benötigt werden (Beck et al., 2009b; Dancourt and Barlowe, 2010). Die Assemblierung des COPI Komplex ist von der kleinen GTPase Arf1 abhängig. Membran-gebundenes aktiviertes Arf1-GTP rekrutiert die Komponenten des COPI Komplex zur Golgi Membran um Vesikel auszubilden (Ostermann et al., 1993; Serafini et al., 1991). Die Aktivierung von Arf1 wird dabei über mehrere Arf1-spezifische *GTP exchange factors* (GEFs) und *GTPase activating proteins* (GAPs) reguliert (Gillingham and Munro, 2007). Brefeldin A, ein bekannter Pilzmetabolit, interferiert mit dem sekretorischen Weg vieler Organismen, in dem die Ausbildung von COPI Vesikeln inhibiert wird. Dies führt zu einem Kollaps des Golgi-Apparates, und in Folge zum Zusammenbruch des sekretorischen Weges (Lippincott-Schwartz et al., 1989; Peyroche et al., 1999). Brefeldin A wird deshalb häufig verwendet, um sekretorische Prozesse innerhalb einer Zelle zu untersuchen.

Lösliche ER-residente Proteine die auf die Aminosäuresequenz KDEL oder ähnliche xDEL Motive (wobei x für eine beliebige Aminosäure steht) enden, werden im *cis*-Golgi von einem KDEL Rezeptor erkannt und über COPI Vesikel zum ER zurück transportiert (Majoul et al., 1998; Nilsson and Warren, 1994). Die KDEL Rezeptoren sind zwischen verschiedenen Spezies hoch konserviert; das erste Mitglied wurde über einen genetischen Screen für ER Retentions-defiziente (*erd*) Mutanten in Hefe identifiziert (Semenza et al., 1990). Der KDEL Rezeptor (ERD2) lokalisiert unter physiologischen Umständen hauptsächlich am *cis*-Golgi,

wird jedoch in Folge einer Überexpression von xDEL sekretorischen Proteinen zum ER umverteilt (Lewis and Pelham, 1992). Die Interaktion von ERD2 mit spezifischen xDEL Liganden wurde anhand verschiedener Ansätze umfassend untersucht. Verschiedene Spezies bevorzugten dabei unterschiedliche Variationen des C-terminalen xDEL Motivs, um ER-residente Proteine zum ER zurückzuführen (Lewis et al., 1990; Scheel and Pelham, 1996; Wilson et al., 1993).

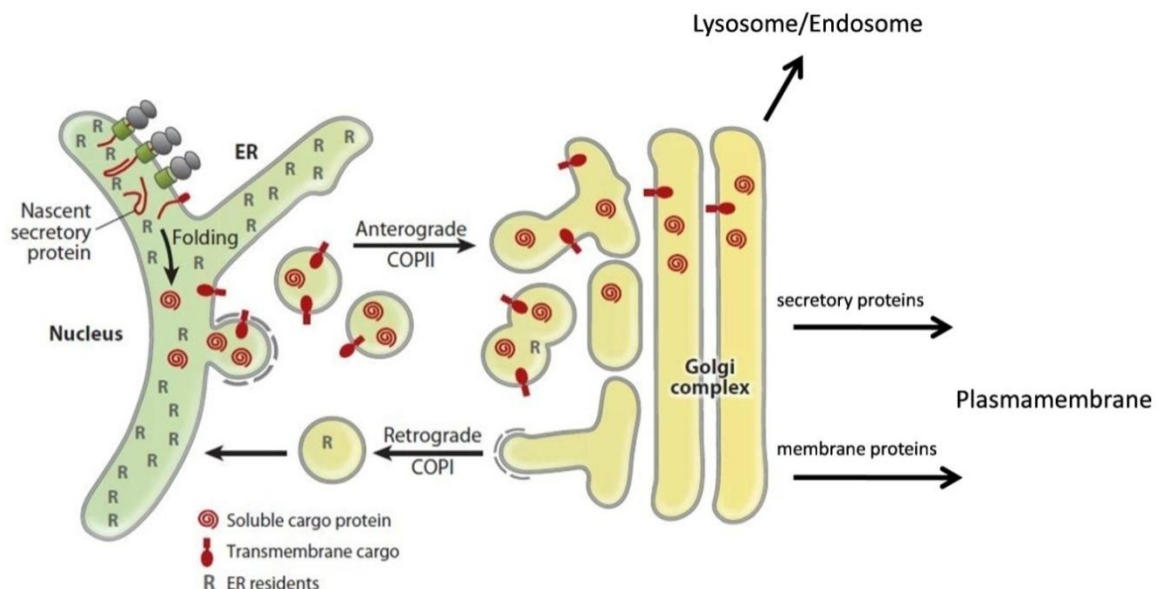


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des sekretorischen Weges [modifiziert von (Dancourt and Barlowe, 2010)]. Sekretorische Proteine werden co-translational ins ER inseriert. Nach ihrer korrekten Faltung, werden sie in COPII Vesikeln zum Golgi-Apparat transportiert, progressieren durch die Zisternen und werden ausgehend von der *trans* Seite des Golgi zu Endosom/Lysosom oder zur Plasmamembran sortiert, in welche sie entweder inseriert werden (Membranproteine), oder über welche sie ins umgebende Medium sezerniert werden (sekretorische Proteine). ER-residente Proteine (R) werden im *cis* Golgi erkannt und über COPI Vesikel zum ER zurück transportiert.

1.5.2 Der späte sekretorische Weg

Sekretorische Proteine werden über COPII Vesikel zunächst zum Golgi-Apparat transportiert. Dieser setzt sich in höheren Vertebraten aus mehreren Zisternen zusammen, die ein gestapeltes Membransystem mit definierten *cis* und *trans* Bereichen bilden (Marra et al., 2007). Nachdem sekretorische Proteine im *cis*-Golgi ausgeschüttet wurden, durchwandern sie diesen und werden dabei oftmals weiter modifiziert (Wilson et al., 2011). Das *trans-Golgi network* (TGN) bildet das finale Logistikzentrum, von wo aus sekretorische Proteine zu ihren eigentlichen Zieldestinationen sortiert und transportiert werden (Baldassarre et al., 2000; De Matteis and Luini, 2008). Identifizierte vom TGN ausgehende Vesikel tragen zumeist Clathrin und *adaptor protein* (AP) Coat Proteine (Robinson and Bonifacino, 2001; Schmid, 1997). Die molekulare Zusammensetzung vieler Vesikel ist jedoch bislang unbekannt.

1.5.3 Der sekretorische Weg in *P. falciparum*

Der frühe sekretorische Weg in *P. falciparum* ist vergleichbar mit dem anderer Eukaryoten. Über N-terminale Signalsequenzen wird die co-translationale Insertion von sekretorischen Proteinen ins ER vermittelt, vermutlich über Komponenten des Sec61 Translokon (Couffin et al., 1998). Im Inneren des ER erfolgt die Abspaltung des Signalpeptids und die korrekte Faltung der Proteine, über eine Reihe an Chaperonen, Co-Chaperonen und anderen Enzymen (Kumar et al., 1991; Shonhai et al., 2007; Tuteja et al., 2008). Die post-translationale Ausbildung von Disulfidbrücken wird von einer ER-residenten Disulfid Isomerase vermittelt (Mahajan et al., 2006; Mouray et al., 2007). Im Gegensatz zu den meisten anderen Eukaryoten findet eine N-Glykosylierung von Proteinen in *P. falciparum* nur bedingt oder gar nicht statt, was sich am Fehlen der meisten dafür benötigten Enzyme verdeutlicht (Anantharaman et al., 2007; Gowda and Davidson, 1999). Falsch gefaltete Proteine werden vermutlich ins Zytoplasma transloziert und für eine Degradation im Proteasom markiert. Komponenten der *ER-associated degradation* (ERAD) Maschinerie konnten *in silico* nachgewiesen und teilweise näher charakterisiert werden (Chung et al., 2012; Sommer et al., 2007; Spork et al., 2009). Proteine die sekretiert werden, oder für andere Kompartimente stromabwärts des ER bestimmt sind, werden in COPII Vesikel verpackt. Homologe aller Kernkomponenten des COPII Komplex sind im Genom von *P. falciparum* vorhanden, von denen einige näher charakterisiert und am ER nachgewiesen wurden (Adisa et al., 2001; 2007; Lee et al., 2008; Struck et al., 2008b). Die Abschnürung der Vesikel findet vermutlich an speziellen *ER exit sites* statt (Lee et al., 2008; Struck et al., 2008b). Wie bereits erwähnt, ist der Golgi-Apparat in *P. falciparum* morphologisch reduziert; dieser rudimentäre Aufbau wird als eine Folge der stark verminderten Kapazität zur N-Glykosylierung von Proteinen in *P. falciparum* diskutiert (Bannister et al., 2004; Bannister and Mitchell, 1995; Ward et al., 1997). Der reduzierte Golgi-Apparat von *P. falciparum* enthält jedoch Homologe von bekannten Golgi-Proteinen mit gut beschriebenen Funktionen in anderen Organismen, wie *Golgi-reassembly stacking proteins* GRASPs (Struck et al., 2005; 2008a) oder die GTPase Rab6 (de Castro et al., 1996; Van Wye et al., 1996). Ein Homolog des ERD2 Rezeptors, sowie Homologe des COPI Komplex konnten ebenfalls am Golgi von *P. falciparum* nachgewiesen werden (Adisa et al., 2007; Elmendorf and Haldar, 1993; Van Wye et al., 1996). In *P. falciparum* identifizierte molekulare Komponenten des späten sekretorischen Weges, ausgehend vom Golgi, beinhalten einige SNAREs, Rabs, sowie Clathrin und AP Coat Proteine (Ayong et al., 2007; Ayong et al., 2009; Nevin and Dacks, 2009; Quevillon et al., 2003). Die exakte Rolle dieser Komponenten beim Proteintransport von *P. falciparum* ist jedoch weitestgehend unerforscht.

Das Ziel des *default* sekretorische Weges in *P. falciparum* ist das Lumen der PV, welche den Parasiten vom Wirtszellzytosol abgrenzt und hinsichtlich des Proteintransports eine Barriere bildet, die es zu überwinden gilt (Lingelbach and Przyborski, 2006). Die Sekretion von Parasiten Proteinen über die PVM ins Wirtszellzytosol oder an die Plasmamembran des infizierten Erythrozyten, erfordert weitere komplexe *targeting* Informationen und Transportsysteme (Deponte et al., 2012), auf die hier nicht näher eingegangen wird. Innerhalb des Parasiten erfolgt der Transport von Proteinen zu den einzigartigen Organellen von *Plasmodium*, wie der Nahrungsvakuole oder dem Apikalkomplex, ebenfalls entlang des sekretorischen Weges (Deponte et al., 2012). Auch der Proteintransport zum Apicoplasten von *P. falciparum* ist ein (zunächst) sekretorischer Prozess, der im Folgenden näher erläutert wird.

1.6 Proteintransport zum Apicoplasten

Die komplexe sekundäre Plastide von *P. falciparum* ist von 4 Membranen umgeben. Aus evolutionärer Sicht repräsentieren die beiden inneren Membranen die primäre Plastide des einstigen Rotalgen Endosymbionten. Die zweitäußerste Membran, oder Periplastidmembran (PPM), des Apicoplasten ist vermutlich ein Überbleibsel der Plasmamembran des einstigen Endosymbionten, während die äußere Membran vom Endomembransystem der früheren Wirtszelle abstammt (Goodman and McFadden, 2012). Das kleine 35 kb Genom des Apicoplasten selbst umfasst weniger als 50 Gene, deren Produkte hauptsächlich an *housekeeping* Prozessen beteiligt sind. Die große Mehrzahl des vorhergesagten Apicoplast Proteoms ist im Zellkern kodiert (Foth et al., 2003; Gardner et al., 2002; Ralph et al., 2004b) und muss daher post-translational in die Plastide reimportiert werden, was die Etablierung entsprechender Transportwege und - Signale voraussetzt.

1.6.1 *Targeting* Signale

In der Regel wird der Transport von Apicoplast Proteinen durch eine N-terminale zweiteilige Signalsequenz vermittelt, die als *bipartite topogenic signal* (BTS) bezeichnet wird und sich aus einem Signalpeptid und einem daran anschließenden Transitpeptid zusammensetzt (Waller et al., 1998). Das Signalpeptid ist vergleichbar mit Signalpeptiden von sekretorischen Proteinen und vermittelt die co-translationale Insertion ins Lumen des ER, vermutlich über Komponenten des Sec61-Translokon (McFadden, 2011; Waller et al., 2000). Signalpeptide von Apicoplast Proteinen können mit kanonischen Signalpeptiden anderer sekretorischer Proteine ausgetauscht werden, ohne den Transport zum Apicoplasten zu

beeinträchtigen, was dafür spricht, dass sie über die Einleitung in den sekretorischen Weg hinaus, keine weiteren *targeting* Informationen enthalten (Tonkin et al., 2006b). Nach der co-translationalen Abspaltung des Signalpeptids (van Dooren et al., 2002) wird das Transitpeptid im Lumen des ER exponiert und vermittelt den weiteren Transport des Proteins zum und in den Apicoplasten (DeRocher et al., 2000; Harb et al., 2004; Waller et al., 2000). Im Inneren des Apicoplasten wird das Transitpeptid proteolytisch gespalten, vermutlich von einem Homolog der Chloroplasten *stromal processing peptidase* (SPP), und das reife Protein ins Stroma entlassen (van Dooren et al., 2002). Transitpeptide können erheblich in ihrer Länge variieren und haben keine bestimmte Konsensus-Sequenz (Ralph et al., 2004a; Zuegge et al., 2001). Eine positive Gesamtladung am N-terminalen Ende des Transitpeptids ist jedoch essentiell für einen gezielten Apicoplast Transport (Foth et al., 2003). Entsprechend dem enormen AT Gehalt des *P. falciparum* Genoms wird diese verstärkt von Lysinen und Asparaginen vermittelt (Ralph et al., 2004a). Die meisten Transitpeptide besitzen eine vorhergesagte Hsp70 - Bindestelle (Foth et al., 2003; Tonkin et al., 2008a); ein Apicoplast spezifisches Hsp70 wurde bislang jedoch nicht identifiziert. Transitpeptide besitzen keine bestimmte Sekundärstruktur (Ralph et al., 2004a). Im Gegenteil konnte gezeigt werden, dass sie funktionell unstrukturiert sind; die Ausbildung von Sekundärstruktur verhindert einen effektiven Apicoplast Import, und Aminosäuren mit dem Hang zur Ausbildung von alpha-Helices sind in Transitpeptiden unterrepräsentiert (Gallagher et al., 2011). Wie, wann und wo Transitpeptide erkannt und vom *default* sekretorischen Weg zum Apicoplasten hin sortiert werden, ist bis heute vollkommen unklar.

Ebenfalls unklar ist, wie zwischen stromalen Proteinen und Proteinen, deren Zieldestination ein Zwischenkompartiment innerhalb der 4 Membranen ist, unterschieden wird. In einigen anderen Organismen mit komplexen Plastiden wird die Passage ins Stroma von einer aromatischen Aminosäure (oder einem Leucin) an der +1 Position nach dem Transitpeptid vermittelt, während das Fehlen dieser Aminosäure in einer Lokalisierung des Proteins zwischen der äußeren und zweitäußersten Membran resultiert (Gould et al., 2006; Gruber et al., 2007; Kilian and Kroth, 2005). Ein ähnliches Motiv konnte in Apicomplexen bislang jedoch nicht identifiziert werden. Desweiteren gibt es einige Apicoplasten Proteine, insbesondere Membranproteine, die keine typische N-terminale BTS aufweisen, sondern intrinsische nicht-spaltbare oder bislang nicht eindeutig identifizierte *targeting* Informationen enthalten (DeRocher et al., 2012; Karnataki et al., 2007a; 2007b; 2009; Lim et al., 2009; Mullin et al., 2006; Sheiner et al., 2011).

1.6.2 Transport über die äußere Apicoplasten Membran

Der Proteintransport zum Apicoplasten ist ein zunächst sekretorischer Prozess, bei dem Proteine co-translational ins ER inseriert und anschließend von dort zu ihrem eigentlichen Bestimmungsort transportiert werden (DeRocher et al., 2000; Waller et al., 2000). Wie die Proteine jedoch vom ER zum Apicoplasten gelangen ist derzeit weitestgehend unbekannt. Es stehen mehrerer Modelle zur Diskussion (Abb. 1.4), wobei in der gegenwärtigen Literatur ein direkter Vesikeltransport vom ER zum Apicoplasten, unter Ausschluss des Golgi-Apparates, favorisiert wird (DeRocher et al., 2005; DeRocher et al., 2008; Tonkin et al., 2006a; Tonkin et al., 2006b). Es wurde bereits mehrfach von Vesikeln in der Peripherie des Apicoplasten berichtet (DeRocher et al., 2008; Karnataki et al., 2007a; Tawk et al., 2011; van Dooren et al., 2009), von denen angenommen wird, dass sie mit der äußeren Membran des Apicoplasten fusionieren um ihre Cargo-Proteine zu entlassen. Die molekularen Details dieses Vorgangs sind bis jetzt jedoch nicht bekannt. Der Proteintransport zum Apicoplasten von *Toxoplasma gondii* und *Plasmodium falciparum* kann auch unter Einfluss von Brefeldin A teilweise stattfinden (DeRocher et al., 2005; Tonkin et al., 2006b), weshalb bevorzugt von einem Golgi-unabhängigen Transportweg ausgegangen wird.

Basierend auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen, wurden auch direkte Kontaktstellen zwischen Apicoplast und ER postuliert, denen möglicherweise eine funktionelle Rolle beim Transport von Proteinen vom ER zum Apicoplasten zukommt (Tomova et al., 2006; Tomova et al., 2009). Jüngste elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigen die bekannte enge räumliche Nähe des Apicoplasten zum ER; eine durchgängige Verbindung dieser beiden Organellen wurde jedoch nicht beobachtet (Lemgruber et al., 2013).

1.6.3 Transport über die zweitäußerste Apicoplasten Membran

Apicoplast Proteine werden vermutlich durch die Fusion von Transportvesikeln mit der äußeren Membran in den Raum zwischen äußerer und Periplastidmembran freigesetzt. Aus evolutionärer Sicht repräsentiert die Periplastidmembran die Plasmamembran des einstigen Rotalgen-Endosymbionten. Die Etablierung eines Proteintransportsystems über diese Membran hinweg stellt einen kritischen frühen Schritt für eine erfolgreiche Endosymbiose dar (Cavalier-Smith, 2003).

In Apicomplexen und anderen Organismen mit komplexen Plastiden von Rotalgen-Ursprung, wird dieser Transport über eine abgewandelte Form der ERAD Maschinerie vermittelt, die als *symbiont-derived ERAD-like-machinery* (SELMA) (Hempel et al., 2009) bezeichnet wird. Das kanonische ERAD ist Teil der ER-Qualitätskontrolle und verantwortlich für die Re-

Translokation falsch gefalteter Proteine ins Zytoplasma, wo sie durch die Anheftung von Poly-Ubiquitinketten für eine Degradation im Proteasom markiert werden (Bagola et al., 2011; Mehnert et al., 2010; Smith et al., 2011). Erste Hinweise auf ein ERAD-ähnliches Translokationssystem über die Periplastidmembran komplexer Plastiden hinweg, stammen aus 2007, als in den Sequenzdaten des Nucleomorphs von *Guillardia theta* Symbiont-spezifische ERAD Komponenten entdeckt wurden (Sommer et al., 2007). Nucleomorphe sind stark reduzierte Zellkerne des einstigen Endosymbionten, die in einigen sekundär-endosymbiotischen Organismen zwischen zweiter und dritter Membran der komplexen Plastide liegen, und meist nur noch für wenige Proteine kodieren (Douglas et al., 2001; Wastl and Maier, 2000). Die Entdeckung einer Symbiont-spezifischen ERAD Maschinerie im Nucleomorph dieser Alge, trieb die Hypothese voran, dass die Umlagerung einer bereits bestehenden Translokationsmaschinerie vom ER zur Plasmamembran des einstigen Endosymbionten die entscheidende Erfindung im Hinblick auf den Import von Proteinen in komplexe Plastiden war (Sommer et al., 2007). In Übereinstimmung mit dieser Hypothese, konnten auch in den Genomen anderer Organismen mit komplexen Plastiden ohne Nucleomorph, einschließlich *P. falciparum* und *Toxoplasma gondii*, Duplikate einiger dieser ERAD Komponenten identifiziert und teilweise näher charakterisiert werden (Agrawal et al., 2009; Felsner et al., 2011; Kalanon et al., 2009; Sommer et al., 2007; Spork et al., 2009). Diese beinhalten das Membranprotein Der1, das vermutlich den Translokationskanal bildet, die AAA-ATPase Cdc48 und ihren Co-Faktor Ufd1. Desweiteren gibt es eine Reihe von vorhergesagten Enzymen der Ubiquitinierungs-Maschinerie. Einige konnten bereits in komplexen Plastiden von Apicomplexen und Diatomeen nachgewiesen werden, oder besitzen N-terminale Sequenzen, die eine entsprechende Lokalisierung vermuten lassen (Hempel et al., 2010; Moog et al., 2011; Ponts et al., 2011; Spork et al., 2009). Die genaue Funktion von Ubiquitin während des Translokationsprozesses ist derzeit nicht eindeutig geklärt. Es wird jedoch angenommen, dass die Translokation über die Periplastidmembran Ubiquitin-abhängig erfolgt (Hempel et al., 2010; Stork et al., 2012).

1.6.4 Transport über die zwei inneren Membranen des Apicoplasten

Mit Hinblick auf den endosymbiotischen Ursprung des Apicoplasten, repräsentieren die beiden inneren Membranen aus evolutionärer Sicht die primäre Plastide des einstigen Rotalgen-Endosymbionten. In primären Plastiden wird der Proteinimport über zwei gut beschriebene Proteinkomplexe, den *translocon of the outer chloroplast membrane* (TOC) und den *translocon of the inner chloroplast membrane* (TIC) vermittelt (Soll and Schleiff, 2004; Strittmatter et al., 2010). Es wird daher angenommen, dass der Transport über die beiden inneren Apicoplast Membranen hinweg durch ein plastid-spezifisches, zum TIC/TOC

Komplex der primären Plastiden homologes Transportsystem ermöglicht wird (van Dooren et al., 2001). Tatsächlich konnten zwei Komponenten des TIC-Komplex im Apicoplasten nachgewiesen werden; das integrale Membranprotein Tic20 (van Dooren et al., 2008) und das Chaperon Tic22 (Glaser et al., 2012; Kalanon et al., 2009). Im *Toxoplasma* System konnte beiden eine essentielle Rolle, sowohl bei der Biogenese des Apicoplasten, als auch im Hinblick auf die Viabilität des Parasiten zugeschrieben werden. Ein Hauptbestandteil des TOC-Komplex in primären Plastiden der Pflanzen ist das Poren-bildende von Cyanobakterien abstammende β -barrel Membranprotein Toc75 (Andr  s et al., 2010; Soll and Schleiff, 2004). Die Identifizierung eines entsprechenden Homologs in Organismen mit komplexen Plastiden blieb lange Zeit erfolglos und führte zur Hypothese, dass dieser Translokation Komplex im Laufe der Evolution verloren ging, und durch ein anderes, unbekanntes Importsystem ersetzt wurde (Cavalier-Smith, 2003; Tonkin et al., 2008b). In 2010 konnte schließlich jedoch erstmals ein Toc75 Homolog in der dritten Plastidenmembran der apicomplexen-verwandten Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* nachgewiesen werden. Bioinformatische Analysen führten außerdem zur Identifizierung entsprechender Homologe in *Toxoplasma gondii* und *Plasmodium falciparum* (Bullmann et al., 2010), deren Lokalisierung im Apicoplasten äußerst wahrscheinlich scheint (Bietz, Heiny und Przyborski; unveröffentlichte Daten). Obwohl eine funktionelle Konservierung zwischen den beiden inneren Apicoplasten Membranen und primären Plastiden aufgrund bislang bekannter Daten äußerst naheliegend ist, wäre der Nachweis eines Porin-ähnlichen β -barrel Membranproteins in dieser Apicoplasten Membran eine eindeutige Bestätigung der Homologie zur äußeren Membran Gram-negativer Bakterien (McFadden, 2011).

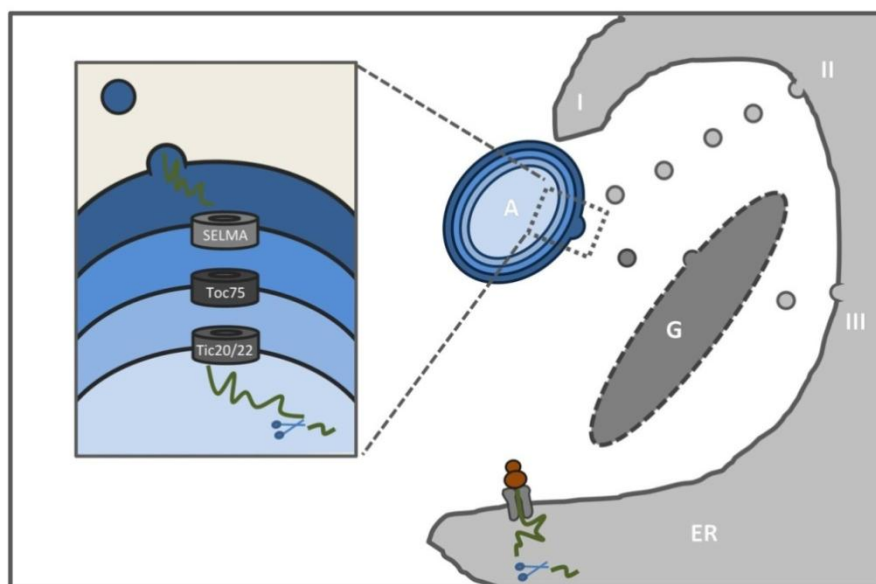


Abb. 1.5: Gegenwärtige Modelle des Proteintransports zum Apicoplasten.

Während der co-translationalen Insertion ins ER wird das Signalpeptid Apicoplast-gerichteter Proteine abgespalten. Das so exponierte Transitpeptid vermittelt den weiteren Transport zur Plastide. Dieser erfolgt entweder über direkte Kontaktstellen zwischen ER und äußerer Membran (I) oder über vesikuläre Transportsystem entweder direkt vom ER zur äußeren Plastiden

Membran (II) oder über einen Zwischenschritt im Golgi-Kompartiment (III). Nach der Fusion von Transportvesikeln mit der äußeren Apicoplasten Membran werden Proteine über Komponenten des SELMA Komplex über die Periplastidmembran, und über zum TIC/TOC System der primären Plastiden homologe Translokation-Komplexe über die beiden inneren Membranen transportiert. Im Lumen des Apicoplasten erfolgt schließlich die Prozessierung des Transitpeptids. ER: endoplasmatisches Retikulum; G: Golgi-Apparat; A: Apicoplast.

1.7 Ziel dieser Arbeit

Wie die meisten apicomplexen Parasiten, besitzt *Plasmodium falciparum* einen Apicoplasten der von 4 Membranen umschlossen ist. Im Apicoplasten finden für den Parasiten essentielle biochemische Synthesewege statt, welche eine potentielle Angriffsfläche für die Entwicklung neuer anti-Malaria Medikamente bieten (Goodman and McFadden, 2012; Yeh and DeRisi, 2011). Der Großteil der für dieses Organell bestimmten Proteine ist jedoch im Zellkern kodiert und muss daher post-translational in die Plastide importiert werden; ein komplexer Vorgang, der aufgrund seiner Besonderheit der 4 Membranen Barriere in den letzten Jahren großes wissenschaftliches Interesse auf sich gezogen hat. Während der Transport über die 3 inneren Membranen hinweg, und die daran beteiligten Translokationssysteme in den letzten Jahren eingehend erforscht wurden, ist noch immer weitestgehend ungeklärt, wie Proteine vom ER zur äußeren Apicoplasten Membran gelangen. In der gegenwärtigen Literatur wird ein Modell favorisiert, in dem für den Apicoplasten bestimmte Proteine bereits im Lumen des ER erkannt, vom sekretorischen Weg aussortiert, und über ein spezielles vesikuläres Transportsystem auf direktem Weg vom ER zur Plastide transportiert werden. Dieses Modell beruht maßgeblich auf der Beobachtung, dass der Transport von Apicoplast Proteinen von Brefeldin A nicht inhibiert wird (Tonkin et al., 2006b). Einige experimentelle Daten können anhand des Golgi-unabhängigen Transport Modells jedoch nicht vollends erklärt werden, was uns zu der Annahme führt, dass lösliche Apicoplast Proteine über einen Zwischenschritt im Golgi-Kompartiment zur Plastide sortiert werden. Das Paradigma eines Golgi-unabhängigen Proteintransports zum Apicoplasten von *P. falciparum* soll in dieser Arbeit neu aufgegriffen und untersucht werden. Dafür sollen transgenen Parasiten hergestellt werden, die Reporterproteine mit N-terminalen Apicoplast *targeting* Signalen und C-terminalen ER *retrieval* Sequenzen exprimieren. Die Lokalisierung und Prozessierung dieser Reporterproteine soll anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie und protein-biochemischen Methoden analysiert werden. Desweiteren soll der Effekt von Brefeldin A auf die Lokalisierung und Prozessierung von Apicoplast-gerichteten Reporterproteinen näher untersucht werden; auch im Kontext einer Brefeldin A - resistenten *P. falciparum* Zelllinie.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Agarosegelkammer	Gibco BRL
Autoklav VX-150 Systec	Systec GmbH
Autoklav Varioklav 400/500 EPZ	Thermo Scientific
Belichtungskassetten	Rego
Blotting Apparatur	Phase
Eismaschine (AF-20)	Scotsman
Elektroporator (Gene Pulser II)	Biorad
Feinwaage (2414)	Sartorius
Geldokumentationssystem	INTAS
Geltrockenapparatur (Slab Dryer 224)	Biorad
Inkubator G24 Shaker	New Brunswick Scientific
Inkubator G25	New Brunswick Scientific
Inkubator C200	Labotect
Laborroller Spiramax5	Denley
Magnetrührer (Combimag RCH)	IKA
Mikroskop (Axiostar plus)	Zeiss
Mikroskop (Vista vision)	VWR
Mikroskop (Axio Observer Z1)	Zeiss
Mikrowelle (Micromaxx)	Medion
PCR Cycler (T-Personal)	Biometra
pH-Meter	Calimatic; Greisinger Electronic GmbH
Power Supply (PowerPac basic)	Bio-RAD

Spektrophotometer (WPA Biowave S2100)	Biochrom
Sterilbank (Flow Hera Safe)	Heraeus
Thermomixer (5436)	Eppendorf
Trockenschrank	Heraeus
Vortexer (Vortex-genie 2)	Scientific Industries
Waage (P1200)	Mettler
Waage (1205 MP)	Sartorius
Wasserbad	Köttermann
Wippschüttler (Duomax 1030)	Heidolph
Zentrifuge (5804R)	Eppendorf
Zentrifuge (Mikro 22R)	Hettich Zentrifugen
Zentrifuge (Biofuge pico)	Heraeus
Zentrifuge (RC6+)	Sorvall

2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Glaswaren

Cryotubes	Sarstedt
Deckgläser	Roth
Elektroporationsküvetten	Biorad; Peqlab
Erlenmeyerkolben	Kobe
Glasflaschen	Schott
Kanülen	Braun; Roth
Kulturflaschen (steril)	Greiner
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell
Objektträger	VWR
Pasteurpipetten	Brand GmbH
Petrischalen	Greiner; VWR
Pipetten	VWR

Pipettenspitzen	VWR; Sarstedt; Greiner
Plastikpipetten (Einweg; steril)	Sarstedt; VWR
Reaktionsgefäße	Eppendorf; Greiner; Sarstedt
Röntgenfilme (medical X-ray films RX)	Fuji
Whatman Filterpapier	Schleicher & Schuell

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

1 kb+ DNA Ladder	Invitrogen
1,4-dithio-DL-threitol (DTT)	Roth
Agar	Roth
Agarose (Molecular Biology Grade)	Eurogentec
Ammoniumhydroxid	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Ammoniumsulfat	Roth
Ampicillin	Roth
Brefeldin A	Sigma
Bromphenolblau	Amersham Biosciences
Calciumchlorid	Roth
Chloroform	Roth
Coomassie Brilliant Blue (G250)	Applichem
D-Glucose	Roth
D-Sorbit	Roth
Dikaliumhydrogenphosphat	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
Enhance	Perkin Elmer
Essigsäure (rein)	Roth
Ethanol p.a.(EtOH)	Roth
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, Roth

Ethylendiamintetra-acetic acid (EDTA)	Roth
EasyTag™ EXPRESS35S Protein Labeling Mix [³⁵ S]	Perkin Elmer
Glutamin	Sigma
Glutaraldehyd	Roth
Glycerol	Applichem
Glycin	Roth
Guanidin Hydrochlorid	Applichem
Hefeextrakt	Roth
HEPES	Applichem
Hoechst 3325	Molecular probes
Hydrochinon	Applichem
Hydrogenperoxid	Merck
Isopropanol	Roth
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
Kaliumacetat	Applichem
Kaliumbromid	Applichem
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kaliumhydroxid	Roth
Kanamycin	Roth
Kresolrot	Sigma
LB-Agar (Lennox)	Roth
Luminol	Applichem
Magnesiumchlorid	Roth
Magnesiumsulfat	Roth
Methanol	Roth
Metol	Roth
Milchpulver (blotting grade)	Roth
Natriumacetat	Roth

Natriumcarbonat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem
Natriumhydroxid	Merck
Natriumsulfit	Roth
NNN`N-tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
p-Cumarsäure	Roth
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Fermentas
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas
Paraformaldehyd	Sigma
Pepton	Roth
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1)	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva
Polyethylenglycol 6000 (PEG)	Applichem
Ponceau S	Roth
Protease Inhibitor Cocktail (Set III)	Calbiochem
Rotiphorese®Gel 30	Roth
Salzsäure 37%	Roth
Saponin	Roth
SOB-Medium	Roth
Sucrose	Roth
Trichloressigsäure (TCA)	Roth
Tris	Applichem
Triton-X-100	Roth
Wasser (steril, pyrogen-frei)	Roth

2.1.4 Materialien für die Zellkultur

AlbuMAXII	Invitrogen
Blasticidin S	Invivo Gen
Brefeldin A	Sigma
D-Sorbit	Sigma
Gelafundin	B. Braun AG
Giemsa	Merck
Glutamin	Sigma
Humanes Erythrozytenkonzentrat (A/rh ⁺)	Universitätsklinikum Marburg
Humane Erythrozyten (0/rh ⁺)	Universitätsklinikum Marburg
Humanes Plasma (A/rh ⁺)	Universitätsklinikum Marburg
Hypoxanthin	CC Pro
Neomycin	Sigma
RPMI-1640 Medium	PAA
RPMI-1640 Medium	Gibco
RPMI-1640 Medium (ohne L-Methionin, L-Cystein, L-glutamin)	Sigma
Saponin	Roth
WR 99210	Jacobus Pharmaceuticals

2.1.5 Molekularbiologische Kits

Gelextraktionskit	Seqlab
PCR Aufreinigungskit	Seqlab
Plasmid Miniprep Kit	Peqlab
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Quiagen
Zero Blunt®TOPO®PCR cloning Kit®	Invitrogen
Champion™pET101 Directional TOPO® Expression Kit	Invitrogen

2.1.6 Enzyme

DNase	Applichem
KOD Hot Star DNA Polymerase	Novagen
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	Invitrogen
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs

2.1.7 Antikörper

2.1.7.1 Erstsantikörper

Maus anti-GFP (monoclonal)	Roche
Maus anti-PfHsp70-1 (monoclonal)	T. Blisnick
Kaninchen anti-ACP (polyclonal)	G. McFadden
Kaninchen anti-ERC (polyclonal)	L. Tilley
Kaninchen anti-SERP (polyclonal)	AG Lingelbach

2.1.7.2 Zweitantikörper

Kaninchen anti-Maus Cy3	JacksonImmuno Research Laboratories
Ziege anti-Maus HRP	DAKO
Ziege anti-Kaninchen Cy3	JacksonImmuno Research Laboratories

2.2 Organismen

2.2.1 Parasitenstämme

<i>P. falciparum</i> Klon 3D7	(Walliker et al., 1987)
<i>P. falciparum</i> FCBR BFA ^R	(Baumgartner et al., 2001)
<i>P. falciparum</i> FCBR BFA ^R Klon 7C	diese Arbeit

2.2.2 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> TOP10™	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 Star™ (DE3)	Invitrogen

2.3 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von MWG Biotech AG bezogen.

2.3.1 Oligonukleotide für *P. falciparum* Transfektionskonstrukte

Name	5' zu 3' Sequenz	Unterstrichene Eigenschaften
ACP Primer		
ACP(1-61)_X_F	GGC <u>TCG AGA</u> TGA AGA TCT TAT TAC TTT G	Xho/ Schnittstelle
ACP(1-61)_A_R	GGC <u>CTA GGA</u> CTT TTT AAA GAG CTA GAT GGG	Avr// Schnittstelle
ACP(1-20)_A_R	GGC <u>CTA GGT</u> GTA TTT TTA AAA GCG TTA ACA TAA TAT AG	Avr// Schnittstelle
ACP(K18E)_X_F	GGG <u>CTC GAG</u> ATG AAG ATA TTA TTA CTT TGT ATA ATT TTT CTA TAT TAT GTT AAC GCT TTT <u>GAA</u> AAT ACA CAA AAA GAT	Xho/ Schnittstelle; <i>K18E Mutation</i>
ACP(K22E)_X_F	GGG <u>CTC GAG</u> ATG AAG ATA TTA TTA CTT TGT ATA ATT TTT CTA TAT TAT GTT AAC GCT TTT AAA AAT ACA CAA <u>GAA</u> GAT	Xho/ Schnittstelle; <i>K22E Mutation</i>
GFP Primer		
GFP_A_F	CCG <u>CCT AGG</u> ATG AGT AAA GGA GAA GAA C	Avr// Schnittstelle
GFP_K_R	GGG <u>GTA CCT</u> TAG TAT AGT TCA TCC	Kpn/ Schnittstelle
GFP_KDEL_K_R	GGG <u>GTA CCT</u> TAA <u>AGT TCA TCT TTT</u> TTG TAT AGT TCA TCC ATG CCA TGT G	Kpn/ Schnittstelle; <i>KDEL</i>
GFP_SDEL_K_R	GGG <u>GTA CCT</u> TAA <u>AGT TCA TCA CTT</u> TTG TAT AGT TCA TCC ATG CCA TGT G	Kpn/ Schnittstelle; <i>SDEL</i>

2.3.2 Andere Oligonukleotide

Name	5' zu 3' Sequenz	Verwendungszweck
TOPO_ACP_TP_F	CAC CAT GTT TTT AAA TAG AAA AAA TGA TTA C	pET101TOPO® Expressionsvektor
TOPO_GFP_F	CAC CAT GAG TAA AGG AGA AGA AC	pET101TOPO® Expressionsvektor
TOPO_GFP_R	TTA TTT GTA TAG TTC ATC CAT GCC	pET101TOPO® Expressionsvektor
MAL1_18s	AAC CTG GTT GAT CTT GCC A	Limiting Dilution
MAL1_18s-R	GTA TTG TTA TTT CTT GTC ACT ACC TCT C	Limiting Dilution
Sec7_1	GCA TTT TAA ACA TAG TAC	Sequenzierungsprimer Sec7 Domäne
Sec7_4	GAT TTC TTC ATT TAA AAT ACA ATT ATA TAG	Sequenzierungsprimer Sec7 Domäne
pARL_F	CGT TAA TAA TAA ATA CAC GCA G	Sequenzierungsprimer
pARL_R	CAG TTA TAA ATA CAA TCA ATT GG	Sequenzierungsprimer
M13_F	GTA AAA CGA CGG CCA G	Sequenzierungsprimer
M13_R	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Sequenzierungsprimer
T7_F	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Sequenzierungsprimer
T7_R	TAG TTA TTG CTC AGC GGT GG	Sequenzierungsprimer

2.4 Vektoren

2.4.1 Ausgangsvektoren

Vektor	Referenz
pARL_ACPdsRed	(Spork et al., 2009)
pARL2-GFP	(Gehde et al., 2009)
pARL2	(Przyborski et al., 2005)

2.4.2 *P. falciparum* Transfektionsvektoren

Vektor	Selektionsmarker	<i>P. falciparum</i> Transfektanten	Referenz
pARL_ACP_BTS	β-Laktamase; DHFR	ACP ^{BTS} ACP ^{BTS_BFAR}	diese Arbeit diese Arbeit
pARL_ACP_BTS_KDEL	β-Laktamase; DHFR	ACP ^{BTS_K}	diese Arbeit
pARL_ACP_BTS_SDEL	β-Laktamase; DHFR	ACP ^{BTS_S}	diese Arbeit
pARL_ACP_BTS_K18E	β-Laktamase; DHFR	ACP ^{K18E}	diese Arbeit
pARL_ACP_BTS_K22E	β-Laktamase; DHFR	ACP ^{K22E}	diese Arbeit
pARL_ACP_BTS_K18E_KDEL	β-Laktamase; DHFR	ACP ^{K18E_K}	diese Arbeit
pARL_ACP_BTS_K18E_SDEL	β-Laktamase; DHFR	ACP ^{K18E_S}	diese Arbeit
pARL_ACP_BTS_K22E_KDEL	β-Laktamase; DHFR	ACP ^{K22E_K}	diese Arbeit
pARL_ACP_BTS_K22E_SDEL	β-Laktamase; DHFR	ACP ^{K22E_S}	diese Arbeit
pARL_ACP_SP	β-Laktamase; DHFR	ACP ^{SP}	Ana Erazo; Bachelorarbeit, 2012
pARL_ACP_SP_KDEL	β-Laktamase; DHFR	ACP ^{SP_K}	Ana Erazo; Bachelorarbeit, 2012
pARL_ACP_SP_SDEL	β-Laktamase; DHFR	ACP ^{SP_S}	Ana Erazo; Bachelorarbeit, 2012

2.5 Software/Datenbanken

BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
ClustalW	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
Chromas Lite 2.1	http://www.mylabsoftware.com/sequence-analysis/1979
ExPASy	http://web.expasy.org/
ImageJ 1.46	http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html
NEBcutter V2.0	http://tools.neb.com/NEBcutter2/
PlasmoDB	http://plasmodb.org/plasmo/

2.6 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden	
<u>DNA Extraktionspuffer A (2 x)</u> 100 mM Natriumchlorid; 50 mM Natriumazetat pH 5,2; 1 mM EDTA	<u>DNA Ladepuffer (6x)</u> 1% Bromphenolblau; 30% Glycerol; 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 5 mM EDTA
<u>Kolonie-Mix (6 ml)</u> 1 ml Kresolrot-Lösung; 600 µl Taq Polymerase Puffer (10x); 120 µl dNTPs (10 mM); 4,28 ml Wasser (steril, pyrogenfrei)	<u>Kresolrot-Lösung</u> 60% Saccharose; eine Spatelspitze Kresolrot
<u>TAE Laufpuffer (50x)</u> 2 M Tris; 2 M Essigsäure; 50 mM EDTA	<u>Taq Polymerase Puffer (10x)</u> 200 mM Tris/HCl pH 8.8; 100 mM Kaliumchlorid; 100 mM Ammoniumsulfat; 20 mM Magnesiumsulfat; 1% Triton X-100
<u>TE pH 8,0</u> 10 mM Tris/HCl pH 8,8; 1 mM EDTA	
Medien für die Bakterienkultur	
<u>LB-Agar</u> 35 g/l	<u>SOB Medium</u> 20 g/l Pepton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 mM Natriumchlorid; 2,5 mM Kaliumchlorid; 20 mM Magnesiumchlorid
<u>SOC Medium</u> SOB Medium (autoklaviert); 20 mM Glukose (steril filtriert)	<u>Superbroth Medium pH 7,0</u> 35 g/l Pepton; 20 g/l Hefeextrakt; 5 g/l Natriumchlorid; 5 ml/l Natriumhydroxid

Puffer und Lösungen für die Zellkultur	
<u>Auftaulösungen</u> I. 12% Natriumchlorid (autoklaviert) II. 1,6% Natriumchlorid (autoklaviert) III. 0,9% Natriumchlorid (autoklaviert); 0,2% Glukose (steril filtriert)	<u>Blasticidin S Lösung</u> 4 µg/ml in DMSO; Aufbewahrung bei -80°C
<u>Brefeldin A</u> 4 mg/ml in Ethanol; Aufbewahrung bei -20°C	<u>Cytomix (100 ml)</u> 6 ml 2 M Kaliumchlorid; 7,5 ml 2 M Calciumchlorid; 1 ml 1 M Phosphatpuffer pH 7,6 ; 10 ml 250 mM Hepes/20 mM EGTA (pH 7,6 mit 10 M Kaliumhydroxid); 500 µl 1 M Magnesiumchlorid; in ddH ₂ O; steril filtriert
<u>Einfrierlösung</u> 28% Glycerol; 3% d-Sorbit; 0,65% Natriumchlorid; autoklaviert	<u>Gelafundin Lösung</u> 62,5 % Gelafundin; 37,5 % RPMI 1640
<u>PBS pH 7,4</u> 137 mM Natriumchlorid; 2,7 mM Kaliumchlorid; 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat; 8,3 mM di-Kaliumhydrogenphosphat; in dd H ₂ O; autoklaviert	<u>Sorbitollösung</u> 5% d-Sorbit in ddH ₂ O; Autoklaviert
<u>TE pH 7,6</u> 10 mM Tris/HCl pH 8,8; 1 mM EDTA; Autoklaviert	<u>WR 99210</u> 20 µM in RPMI 1640; Aufbewahrung bei -80°C
Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden	
<u>Ammoniumperoxosulfat (APS)</u> 20% APS in ddH ₂ O	<u>Blocklösung (Western Blot)</u> 5% Milchpulver in PBS pH 7,4
<u>Coomassie-Entfärbelösung</u> 20 % Methanol in ddH ₂ O	<u>Coomassie-Färbelösung</u> 1 g/l Coomassie Brilliant Blue; 40 % Methanol; in ddH ₂ O

<u>Elektrophoresepuffer</u> 124 mM Tris; 960 mM Glycin; 0,05% SDS	<u>Enhanced chemiluminescence (ECL)-Lösung</u> 5 mM Luminol; 0,8 mM p-Cumarsäure; 200 mM Tris/HCl pH 8,5
<u>Entwickler</u> 6,4 mM Metol; 80 mM Hydroquinon; 571 mM Natriumsulfit; 452 mM Natriumcarbonat; 34 mM Kaliumbromid	<u>Fixierer</u> 500 ml AGFA Rapid Fixer G354 in 2,5 l ddH ₂ O
<u>IP Lyse-Puffer</u> 10 mM Tris/HCl pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.5 mM EDTA; 0.5% NP40; 1% SDS; 1 mM PMSF; PIC (1:200)	<u>IP Verdünnungs-Puffer</u> 10 mM Tris/HCl pH7.5; 150 mM NaCl; 0.5 mM EDTA; 1 mM PMSF; PIC (1:200)
<u>Konservierungs-Lösung (für Autoradiographie)</u> 10% PEG; 1% Glycerol; in ddH ₂ O	<u>PBS pH 7,4</u> 137 mM Natriumchlorid; 2,7 mM Kaliumchlorid; 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat; 8,3 mM di-Kaliumhydrogenphosphat; in dd H ₂ O
<u>Probenpuffer (2x)</u> 100 mM Tris/HCl pH 6,8; 5 mM EDTA; 20% Glycerol; 4% SDS; 0,2% Bromphenolblau; 100 mM Di-Thiothreitol (DTT)	<u>Ponceau S Färbelösung</u> 0,2% Ponceau S; 3% Trichloressigsäure
<u>Sammelgelpuffer (4x)</u> 500 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,4% SDS; in ddH ₂ O	<u>Transferpuffer (Western Blot)</u> 48 mM Tris/HCl pH 9,5; 30 mM Glycin; 0,0375% SDS; 20% Methanol
<u>Trenngelpuffer (4x)</u> 1,5 M Tris/HCl pH 8,8; 0,4% SDS; in ddH ₂ O	

Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenzmikroskopie	
<u>Blocklösung</u> 3% BSA in PBS	<u>Fixierungs-Lösung</u> 4% Paraformaldehyd; 0,0075% Glutaraldehyd; in PBS pH 7,4
<u>Permeabilisierungs-Lösung</u> 0,1% Triton X-100; 125 mM Glycin; in PBS pH 7,4	<u>Wasch-Lösung</u> 125 mM Glycin in PBS pH 7,4

2.7 Methoden

2.7.1 Molekularbiologische Methoden

2.7.1.1 Arbeiten mit DNA

2.7.1.1.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die *in vitro* Amplifikation von DNA-Abschnitten erfolgte mittels PCR mit spezifischen Oligonukleotiden (2.3). Als template wurden sowohl Plasmid DNA als auch isolierte DNA von *P. falciparum* verwendet. Für die anschließende Generierung von Transfektionskonstrukten, oder Subklonierung der amplifizierten Fragmente in Sequenzierungsvektoren, wurden die kodierenden Sequenzen mit der KOD Hot Star Polymerase amplifiziert, welche über eine Korrekturlesefunktion verfügt. Für Kolonie-PCRs (2.7.1.2.6) wurde die Taq Polymerase verwendet. Die Magnesium Endkonzentration des Standard PCR Ansatzes (Tab. 1) wurde wenn nötig angepasst. Das Standard PCR Programm (Tab. 2) wurde je nach Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide, der Länge des zu amplifizierenden Fragments, und der verwendeten Polymerase angepasst.

Komponente	End-konzentration	Schritt	Bezeichnung	Temperatur in °C	Zeit in min.
Polymerase Puffer (10x)	1x	1	Initiale Denaturierung	95	5-10
dNTPs (10 mM)	0,1 mM				
MgSo4 (25 mM)	2 mM				
Primer forward (50pmol)	0,1 µM	2	Denaturierung	95	0,5-1
Primer reverse (50 pmol)	0,1 µM	3	Annealing	50-62	0,5-1,5
Template DNA	1 pg -500 ng	4*	Elongation	68 bzw. 72	0,5-3
DNA Polymerase	0,25 - 0,5 U	5	Abschließende Elongation	68 bzw. 72	5-10
ddH ₂ O	Endvolumen von 50 µl	6	Ende	4	∞

*Schritt 4 zu 2 in 30 - 35 Zyklen

Tabelle 1: Standard PCR Ansatz

Tabelle 2: Standard PCR Programm

2.7.1.1.2 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden entsprechend ihrer Größe per Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Diese Methode basiert auf der Migration von negativ geladenen DNA Molekülen durch eine Agarosematrix im angelegten elektrischen Feld. Je nach Länge der DNA-Fragmente wurden 0,8 % - 1,5 % Agarose in 1x TAE aufgelöst und aufgekocht. Um eine Visualisierung der DNA unter UV-Licht zu ermöglichen, wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben bevor das Gel auspolymerisiert wurde. Die Proben wurden mit 6 x Ladepuffer zu einer 1 x Endkonzentration gemischt. Als

Größenstandard wurde der 1 kb+ DNA Ladder (Invitrogen) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 90V in 1 x TAE Laufpuffer.

2.7.1.1.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

PCR Produkte und DNA-Fragmente nach einem Restriktionsverdau wurden entweder mit einem PCR Aufreinigungs Kit (Peqlab) gemäß den Herstellerangaben direkt aus der jeweiligen Reaktionslösung aufgereinigt, oder zunächst über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, und anschließend mit einem Gelextraktions Kit (Peqlab) gemäß den Herstellerangaben aus der Gelmatrix eluiert.

2.7.1.1.4 Präzipitation von DNA

Um DNA aus wässrigen Lösungen auszufällen oder aufzukonzentrieren, wurden 2 Volumen eiskalter 100% Ethanol und 0,1 Volumen 5 M Natriumazetat zugegeben und dieser Ansatz für 30 min. bei -20°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (18.000 rpm, 20 min., 4°C, Mikro 22R) wurde das resultierende DNA Pellet einmal in eiskaltem 70% Ethanol gewaschen, anschließend luftgetrocknet und in ddH₂O oder TE-Puffer resuspendiert.

2.7.1.1.5 Restriktionsverdau von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgte mit Hilfe von spezifischen Restriktionsendonukleasen, die DNA an spezifische Restriktionsschnittstellen erkennen und schneiden, welche oftmals palindromische Sequenzen von 4, 6 oder 8 Basenpaaren sind. Die Restriktionsansätze wurden mit ca. 0,2- 3 µg template DNA und bis zu 10 U der jeweiligen Restriktionsendonukleasen in vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffern angesetzt, und gemäß den Herstellerangaben inkubiert. Die Aufreinigung der geschnittenen DNA erfolgte wie in Abschnitt 2.7.1.1.3. beschrieben.

2.7.1.1.6 Ligation

Vor einer Ligation wurden die zu ligierenden DNA Fragmente und/oder Vektoren zunächst mit Restriktionsendonukleasen verdaut, um überhängende Enden der DNA zu generieren. In der Regel wurden Vektor und Insert in einem stoffmengenbezogenen Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Pro 20 µl Ligationsansatz wurde 1 U der T4 DNA Ligase im vom Hersteller empfohlenen Puffer eingesetzt. Die Ligationsreaktion erfolgte in der Regel bei 16°C über Nacht oder für 2,5 Stunden bei Raumtemperatur. Der Ligationsansatz wurde anschließend

Ethanol präzipitiert (2.7.1.1.4) und für eine nachfolgende Transformation in *E. coli* in 10 µl ddH₂O resuspendiert.

2.7.1.1.7 Herstellung von Transfektions- und Expressionskonstrukten, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Generierung von ACP_BTS Transfektionskonstrukten

Die kodierende Sequenz der BTS von ACP (PlasmoDB: PF3D7_0208500; Basenpaare 1-183) wurde mit den Primern ACP(1-61)_X_F / ACP(1-61)_A_R von ACPdsRed (Spork et al., 2009) amplifiziert. Die kodierende Sequenz von GFP wurde mit den Primern GFP_A_F / GFP_K_R von pARL2-GFP (Gehde et al., 2009) amplifiziert. Die Inserts wurden über die XhoI und AvrII (ACP) Schnittstellen bzw. die AvrII und KpnI (GFP) Schnittstellen in den pARL2 Vektor (Przyborski et al., 2005) kloniert, was im Konstrukt pARL_ACP_BTS resultierte. Die ER retrieval Sequenzen KDEL bzw. SDEL wurden über PCR eingeführt. Vom Ausgangskonstrukt pARL_ACP_BTS wurde ACP_GFP_KDEL mit den Primern ACP(1-61)_X_F / GFP_KDEL_K_R und ACP_GFP_SDEL mit den Primern ACP(1-61)_X_F / GFP_SDEL_K_R amplifiziert, und über die XhoI und KpnI Schnittstellen in den pARL2 kloniert, was die Konstrukte pARL_ACP_BTS_KDEL bzw. pARL_ACP_BTS_SDEL ergab.

Generierung von ACP_SP Transfektionskonstrukten

Die kodierende Sequenz des Signalpeptids von ACP (PlasmoDB: PF3D7_0208500; Basenpaare 1-60) wurde mit den Primern ACP(1-61)_X_F und ACP(1-20)_A_R von pARL_ACP_BTS amplifiziert. In den Konstrukten pARL_ACP_BTS, pARL_ACP_BTS_KDEL und pARL_ACP_BTS_SDEL wurde das ursprüngliche ACP_BTS Fragment (Basenpaare 1-183) jeweils über die XhoI und AvrII Schnittstellen durch das ACP_SP Fragment (Basenpaare 1-60) ersetzt, was zu den Konstrukten pARL_ACP_SP, pARL_ACP_SP_KDEL und pARL_ACP_SP_SDEL führte.

Generierung von ACP_BTS Transfektionskonstrukten mit mutierten ACP Transitpeptiden

Die Mutation von K22 bzw. K18 im Transitpeptid von ACP wurde über PCR eingeführt. Ausgehend vom Konstrukt pARL_ACP_BTS wurde ACP_K22E_GFP mit den Primern ACP(K22E)_X_F / GFP_K_R und ACP_K18E_GFP mit den Primern ACP(K18E)_X_F / GFP_K_R amplifiziert. Über die XhoI und KpnI Schnittstellen wurden die Inserts in den pARL2 kloniert, was in den Konstrukten pARL_ACP_BTS_K22E bzw. pARL_ACP_BTS_K18E resultierte. Die ER retrieval Sequenzen KDEL bzw. SDEL wurden über PCR eingeführt. Vom Konstrukt pARL_ACP_BTS_K22E wurde ACP_K22E_KDEL mit

den Primern ACP(K22E)_X_F / GFP_KDEL_K_R und ACP_K22E_SDEL mit den Primern ACP(K22E)_X_F / GFP_SDEL_K_R amplifiziert, und über die XhoI und KpnI Schnittstellen in den pARL2 kloniert, was die Konstrukte pARL_ACP_BTS_K22E_KDEL bzw. pARL_ACP_BTS_K22E_SDEL ergab. Vom Konstrukt pARL_ACP_BTS_K18E wurde ACP_K18E_KDEL mit den Primern ACP(K18E)_X_F / GFP_KDEL_K_R und ACP_K18E_SDEL mit den Primern ACP(K18E)_X_F / GFP_SDEL_K_R amplifiziert, und über die XhoI und KpnI Schnittstellen in den pARL2 kloniert, was die Konstrukte pARL_ACP_BTS_K18E_KDEL bzw. pARL_ACP_BTS_K18E_SDEL ergab.

Generierung der GFP und ACP Transitpeptid - GFP Expressionskontrollen

Die kodierende Sequenz von GFP wurde mit den Primern Topo_GFP_F / Topo_GFP_R von pARL_ACP_BTS amplifiziert und gemäß den Herstellerangaben in den pET101 Directional TOPO® Expression Vektor (Invitrogen) kloniert. Die kodierende Sequenz für das prozessierte Transitpeptid von ACP (van Dooren et al., 2002) fusioniert an GFP wurde mit den Primern TOPO_ACP_TP_F / Topo_GFP_R von pARL_ACP_BTS amplifiziert und gemäß den Herstellerangaben in den pET101 Directional TOPO® Expression Vektor (Invitrogen) kloniert.

Alle Konstrukte wurden durch automatisierte Sequenzanalysen (GATC, Konstanz) verifiziert.

2.7.1.1.8 Extraktion von DNA aus *P. falciparum* infizierten Erythrozyten

DNA wurde in der Regel aus zuvor Saponin isolierten Parasiten extrahiert (2.7.2.6). Dazu wurde das Saponin Pellet in 200 µl PBS aufgenommen und anschließend mit 200 µl 2x Puffer A (100 mM Natriumchlorid; 50 mM Natriumazetat pH 5,2; 1 mM EDTA) und 100 µl 20% SDS versetzt. Das Reaktionsgefäß wurde mehrmals invertiert und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine dreimalige Extraktion der DNA mit Phenol/Chloroform. Dazu wurde die Zellsuspension zunächst mit 500 µl Phenol/Chloroform gemischt und bei 18.000 rpm für 10 min. abzentrifugiert (Mikro 22R). Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit TE (pH 8,0) auf 500 µl aufgefüllt, und einer erneuten Extraktion unterzogen. Die obere Phase des letzten Extraktionsschrittes wurde mit 2 Volumen 100% Ethanol und 1/10 Volumen 3M Natriumazetat Ethanol-präzipitiert (2.7.1.1.4), in 500 µl TE (pH 8,0) resuspendiert und anschließend mit 500 µl Chloroform extrahiert, um Phenolrückstände zu entfernen. Die obere Phase wurde erneut Ethanol-präzipitiert (siehe oben) und anschließend in 70% Ethanol gewaschen, bevor das DNA Pellet luftgetrocknet und anschließend in ddH₂O oder TE (pH 8,0) resuspendiert wurde. Die Lagerung extrahierter DNA erfolgte bei 4°C.

2.7.1.1.9 Zero Blunt® Sub-Klonierung und Sequenzanalyse von *Plasmodium* Transfektanten

Um den Genotyp erfolgreich transfizierter Plasmodien zu überprüfen, wurde auf der extrahierten DNA (2.7.1.1.8) eine für den pARL Transfektionsvektor spezifische *blunt end* PCR durchgeführt (KOD Polymerase, pARL_F/pARL_R). Die so amplifizierten Fragmente wurden gemäß den Herstellerangaben in den pCR®-Blunt Vektor (Invitrogen) kloniert, in *E. coli* TOP10 transformiert und propagiert, und im Anschluss, nach erfolgter Plasmid-Extraktion, zur Sequenzanalyse verschickt (GATC, Konstanz).

2.7.1.2 Arbeiten mit *E. coli*

2.7.1.2.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Bakterien wurden entweder in flüssigem Superbroth-Medium oder auf kommerziell erhältlichem LB- Agar kultiviert. Als selektierende Antibiotika wurden Ampicillin bzw. Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml eingesetzt. Die *E. coli* Zellen wurden sowohl in Schüttelkulturen (240 rpm) als auch auf Festmedien bei 37°C unter aeroben Bedingungen kultiviert.

2.7.1.2.2 Bestimmung der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen

Die optische Dichte von Bakteriensuspensionen wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Das Kulturmedium wurde als Referenz verwendet. Eine gemessene *E. coli* OD₆₀₀ von 1 entspricht $8,8 \times 10^8$ Zellen/ml.

2.7.1.2.3 Herstellung elektrokompenter *E. coli* Zellen

Eine Vorkultur wurde in 10 ml Superbroth Medium mit *E. coli* Top10 (Invitrogen) inokuliert und schüttelnd bei 37°C bis zur stationären Phase inkubiert. Anschließend wurde die Vorkultur 1:100 in 600 ml Superbroth Medium überführt und für weitere 3,5 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Zellsuspension wurde auf Eis gekühlt und im Anschluss bei 4°C, 6.000 rpm (RC6+) abzentrifugiert. Das verbleibende Bakterienpellet wurde daraufhin 3mal in sterilem, eisgekühltem ddH₂O gewaschen. Abschließend erfolgte ein Waschschrift in sterilem, eisgekühltem 10% Glycerol/ddH₂O, bevor das Pellet in 1,2 ml 10% Glycerol/ddH₂O aufgenommen und in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde. Die Kompetenz der Zellen wurde mittels Transformation von 10 pg eines PUC Referenzvektors überprüft. Die Lagerung der elektrokompenten Zellen erfolgte bei -80°C.

2.7.1.2.4 Transformation von elektrokompetenten *E.coli* Zellen

Pro Transformationsansatz wurden 50 µl elektrokompetenter *E. coli* Top 10 verwendet. Der Ethanol-präzipitierte Ligationsansatz wurde in der Regel in 10 µl ddH₂O resuspendiert und anschließend mit den auf Eis aufgetauten elektrokompetenten Bakterien gemixt. Die Elektroporation wurde in einem Gene-Pulser (Bio-Rad) bei 2 kV, 25 µF, 200 Ω durchgeführt. Anschließend wurden die Bakterien in 1 ml vorgewärmtem SOC-Medium aufgenommen und für 30-60 min bei 37°C schüttelnd inkubiert (G24 Shaker). Die Zellsuspension wurde im Anschluss auf LB-Agar-Festmedium mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

2.7.1.2.5 Transformation von chemisch kompetenten *E.coli* Zellen

Pro Transformationsansatz wurden 50 µl chemisch kompetenter *E. coli* Top 10 (Invitrogen) auf Eis aufgetaut, und anschließend mit dem Ligationsansatz gemischt. Nach einer Inkubation für 20 min. auf Eis, wurden die Bakterien für 30 sec. bei 42°C hitzegeschockt und sofort wieder auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Bakterien 1 ml vorgewärmtem SOC-Medium aufgenommen und für 30-60 min. bei 37°C schüttelnd inkubiert (G24 Shaker). Die Zellsuspension wurde im Anschluss auf LB-Agar-Festmedium mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

Für eine anschließende Expression von Plasmid DNA in *E. coli* BL21 Star™ (DE3) One Shot® (2.7.1.2.8) erfolgte die Transformation der *E. coli* BL21 Star™ (DE3) One Shot® äquivalent, außer dass hitzegeschockte Bakterien in 250 µl vorgewärmtem SOC-Medium aufgenommen wurden, und nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C (G24 Shaker) in 10 ml Superbroth Medium mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum überführt, und über Nacht bei 37°C schüttelnd weiter inkubiert wurden.

2.7.1.2.6 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ermöglicht es mehrere Klone eines Transformationsansatzes auf eine erfolgreiche Transformation hin zu überprüfen. Durch Zugabe eines Vektor-spezifischen Primers, sowie eines für das Insert von Interesse spezifischen Primers, ist ein PCR Produkt nur bei Klonen zu erwarten, die das erfolgreich klonierte Konstrukt enthalten, während religierte Vektoren keine Signale ergeben. Einzelne Klone einer Transformationsplatte wurden zunächst auf eine Replikplatte übertragen und anschließend in den Kolonie-PCR Ansatz überführt. Konnte ein Produkt der zu erwartenden Größe amplifiziert werden, wurde der entsprechende Klon anschließend weiter analysiert.

2.7.1.2.7 Plasmidextraktion

Zur Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien wurden kommerziell erhältliche Plasmid-Extraktionskits von Peqlab (Mini-Päperation) und Quiagen (Maxi-Präparation) verwendet. Für eine Mini-Präparation wurde in der Regel eine 4 ml Kultur angesetzt und gemäß den Herstellerangaben weiter verarbeitet. Für eine Maxi-Präparation wurde in der Regel eine 400 ml Kultur angesetzt. Das resultierende Bakterienpellet wurde zunächst mit doppelten Volumina der vom Hersteller empfohlenen Menge an Resuspensions-, Lyse- und Neutralisierungspuffer bearbeitet; weitere Schritte erfolgten gemäß den Herstellerangaben.

2.7.1.2.8 Expression der GFP- und ACP Transitpeptid-GFP-Kontrolle in *E.coli* BL21 Star™ (DE3)

Chemisch kompetente BL21 Star™ (DE3) One Shot® *E. coli* wurden mit dem pET101 TOPO® Expressionsvektor mit dem Insert von Interesse transformiert (2.7.1.2.5) und über Nacht in 10 ml Suberbroth Medium inkubiert. Von dieser Übernacht-Kultur wurden 500 µl in 10 ml Superbroth-Medium (50 µg/ml Ampicillin) inokuliert und schüttelnd bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in zwei 5 ml Kulturen aufgeteilt; jeweils 500 µl wurden entnommen, abzentrifugiert und gemäß der Formel $[(OD/0,5) \times 100 = X]$ in X µl PBS und X µl 2 x Probenpuffer resuspendiert, aufgeköcht und bei -80°C gelagert (entspricht Zeitpunkt 0). Eine der Kulturen wurde daraufhin durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Anschließend wurden die Kulturen für weitere 4 h inkubiert, wobei jede Stunde eine weitere Probe entnommen und aufbereitet wurde. Für diese Arbeit wurden die Proben des induzierten Zeitpunkts 4 verwendet.

2.7.2 *P. falciparum* Zellkultur

2.7.2.1 Kultivierung von *Plasmodium* Blutstadien

Die *in vitro* Kultivierung von *Plasmodium falciparum* erfolgte unter sterilen Bedingungen in humanen Erythrozyten der Blutgruppe A/Rh⁺, bei einem Hämatokrit von 4% in RPMI-1640 Medium, ergänzt mit 10% humanem, hitzeinaktiviertem Plasma A/Rh⁺, 200 µM Hypoxanthin und 100 µg/ml Neomycin. Die Kulturen wurden in sterilen Suspensionsflaschen bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre von 5% CO₂, 5% O₂ und 90% N₂ gehalten. Die Parasitämie wurde regelmäßig mittels Giemsa Färbung bestimmt, und bei Standardkulturen bei maximal 10% gehalten.

2.7.2.2 Cryokonservierung von *Plasmodien* Kulturen

Kulturen wurden ab einer Parasitämie von mindestens 3% Ringstadien eingefroren. Dazu wurde die Kultur abzentrifugiert (3.000 rpm, 5804R), das verbleibend Blutpellet 1:1 (v/v) mit *Freezing Solution* (28% Glycerol, 3% d-Sorbit, 0,65% NaCl) gemischt, unverzüglich in ein geeignetes Cryo-Gefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der tiefgefrorenen Kulturen erfolgte zunächst für ein paar Tage bei -80°C und anschließend dauerhaft in flüssigem Stickstoff.

2.7.2.3 Auftauen von cryokonservierten *Plasmodien* Kulturen

Die cryokonservierten Kulturen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend in ein 15 ml Falcon überführt. Pro ml Ausgangskultur wurden 200 µl einer 12%-igen NaCl Lösung tropfenweise, unter konstantem Mischen zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 3-4 Minuten wurden 5 ml einer 1,6%-igen NaCl Lösung ebenfalls tropfenweise hinzugefügt. Anschließend wurden 5 ml einer 0,6% Glukose enthaltenden 0,9%-igen NaCl Lösung zugegeben. Die Zellen wurden abzentrifugiert (3.000 rpm, 5804R), einmal in Standardmedium gewaschen und anschließend in bereits vorgewärmtem Medium in Kultur genommen. Die Zugabe eines selektierenden Additivs erfolgte 12-24 Stunden nach dem Auftauen.

2.7.2.4 Synchronisierung von Ringstadien mittels Sorbitol

Die Synchronisierung von frühen Blutstadien, den sogenannten Ringstadien, erfolgte mittels Sorbitol (Lambros and Vanderberg, 1979). Das Prinzip beruht auf einer osmotischen Lyse der mit späteren Stadien infizierter Erythrozyten, die bereits eine erhöhte Permeabilität ausgebildet haben, welche in den mit Ringstadien infizierten Erythrozyten noch nicht zu beobachten ist. Die Kultur wurde abzentrifugiert (3000 rpm, 2 min., Eppendorf 5804R) und das verbleibende Blutpellet 1:10 v/v in einer 5%igen Sorbitollösung resuspendiert. Anschließend erfolgte eine 10-15 minütige Inkubation bei vorzugweise 37°C. Die Zellen wurden erneut sedimentiert, und einmal in Standardmedium gewaschen, bevor sie wieder in Kultur genommen wurden. Um für einige experimentelle Ansätze hochsynchronisierte Kulturen zu erhalten, wurde das Vorgehen nach 4 h wiederholt.

2.7.2.5 Synchronisierung von Trophozoitenstadien mittels Gelafundin

Die Synchronisierung von Trophozoitenstadien erfolgte mittels Gelafundin (Pasvol et al., 1978). Dieses Vorgehen beruht auf dem Prinzip der unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeiten infizierter und nicht infizierter Erythrozyten in einer viskösen Lösung. Während nicht infizierte, sowie mit frühen Stadien infizierte Erythrozyten rasch sedimentieren, setzen sich mit späteren Stadien infizierte Erythrozyten aufgrund der an ihrer Oberfläche ausgebildeten knobs wesentlich langsamer ab, und können daher separiert werden. Die Kulturen wurden abzentrifugiert und das verbleibende Blutpellet 1:10 (v/v) in Gelafundinlösung (62,5% Gelafundin in RPMI 1640) in einem 15 ml Falcon resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C, in aufrechter Position des Reaktionsgefäßes inkubiert, bis eine deutliche Phasentrennung sichtbar war. Die obere, Trophozoiten-enhaltende Phase wurde abgenommen, pelletiert (3000 rpm, 2 min., Eppendorf 5804 R) und einmal in Standardmedium gewaschen, bevor die Parasiten erneut in Kultur genommen wurden.

2.7.2.6 Extraktion von Plasmodien mittels Saponin-Lyse

Um die Parasiten aus ihren Wirtszellen zu isolieren wurde eine Saponin-Lyse durchgeführt (Beaumelle et al., 1987). Das amphipathische Glycosid lysiert sowohl die Erythrozyten Membran, als auch die PVM, während die Plasmamembran des Parasiten intakt bleibt. Die pelletierten Erythrozyten wurden 1:10 (v/v) in eiskaltem PBS (1 mM PMSF, PIC 1:200 (v/v), Calbiochem) resuspendiert, Saponin wurde in einer Endkonzentration von 0,5 % aus einer frisch angesetzten Stocklösung in PBS zugegeben, und das Reaktionsgefäß mehrmals invertiert. Anschließend erfolgte eine 10 minütige Inkubation auf Eis. Die freigesetzten Parasiten wurden sedimentiert (5000 rpm, 3 min, Eppendorf 5804 R) und anschließend solange in eiskaltem PBS (1 mM PMSF, PIC 1:200) gewaschen, bis keine Hämoglobin-Rückstände mehr sichtbar waren. Die so gewonnenen Parasiten wurden entweder in PBS (1mM PMSF, PIC 1:200) und 2 x Probenpuffer (1:1, (v/v)) für anschließende SDS Page Analysen aufgekocht, oder einer Immunpräzipitation unterzogen.

2.7.2.7 Isolierung und Anzucht einzelner *Plasmodium* Klone mittels *Limiting Dilution*

Diese Methode dient dazu Parasiten aus einer Kultur zu vereinzeln (Rosario, 1981) und wurde in dieser Arbeit verwendet um einen einzigen Klon einer BFA-resistenten *P. falciparum* FCBR-Zelllinie (Baumgartner et al., 2001) zu isolieren und zu propagieren. Dafür

wurde zunächst die Parasitämie und anschließend, unter Zuhilfenahme einer Neubauerzählkammer, die Anzahl infizierter Erythrozyten pro μl Ausgangskultur bestimmt. Diese wurde anschließend so verdünnt, dass in einer 96-well Platte theoretisch 0,1 Parasiten pro well eingesetzt werden konnte; was einem einzigen zu erwartenden Parasit in jedem 10. well entspricht. Die Kultivierung in der 96-well Platte erfolgte bei einem Hämatokrit von 4% unter Standardbedingungen und einem konstanten Selektionsdruck von $20 \mu\text{g/ml}$ BFA. Nach 4 Tagen wurde erstmals eine PCR mit Primern gegen das 18srRNA Gen von *Plasmodium falciparum* durchgeführt, um diejenigen wells zu identifizieren, in denen ein Parasit eingesetzt wurde (Maher et al., 2008). Die PCR wurde anschließend jeden zweiten Tag wiederholt, bis Signale erkennbar waren. Die entsprechenden wells wurden in eine 6-well Platte überführt, und regelmäßig mittels Giemsa-Färbung auf ihre Parasitämie untersucht. Sobald genügend Parasiten vorhanden waren, wurde die DNA isoliert (2.7.1.1.8), und auf die Sec7 Mutation überprüft. Zwei Klone konnten auf diese Art und Weise erfolgreich herangezüchtet werden (3H und 7C). Für diese Arbeit wurde der Klon 7C verwendet.

2.7.2.8 Transfektion von *Plasmodium falciparum*

Die Transfektion von *P. falciparum* erfolgte auf Ringstadien ab einer Parasitämie von 5%. Die Parasiten wurden zu diesem Zweck bereits vor der Transfektion in Blut der Blutgruppe 0, Rhesus positiv kultiviert. Für die Transfektion wurden ca. $100 \mu\text{g}$ Plasmid DNA präzipitiert (2.7.1.1.4) und anschließend in $30 \mu\text{l}$ sterilem TE Puffer (pH 7.6) aufgenommen. Anschließend wurden $370 \mu\text{l}$ Cytomix hinzugefügt, und dieser Reaktionsansatz mit $200 \mu\text{l}$ sedimentierter infizierter Erythrozyten gemischt. Die Elektroporation erfolgte in einer $0,2 \text{ cm}$ Elektroporationsküvette bei $0,31 \text{ kV}$ und $950 \mu\text{F}$ (Hochfrequenzkapazität). Unmittelbar nach der Elektroporation wurde der Transfektionsansatz in 12 ml bereits vorgewärmtes RPMI mit $400 \mu\text{l}$ frischer Erythrozyten der Blutgruppe 0, Rhesus positiv überführt. Die Zugabe der Selektionsdroge erfolgte 6-8 h nach der Transfektion. Im Anschluss wurde täglich das Medium gewechselt, solange bis im Giemsa Ausstrich keine lebensfähigen Parasiten mehr sichtbar waren. Anschließend wurde die Kultur 2mal wöchentlich mit frischem Medium versorgt, und spätestens nach 2 Wochen wurde frisches Blut der Blutgruppe 0, Rhesus zugegeben. Sobald Parasiten im Ausstrich erkennbar waren, wurden Aliquots der Kulturen eingefroren (2.7.2.2), und die Transfektanten anschließend unter Standardbedingungen weiterkultiviert.

2.7.3 Proteinbiochemische Methoden

2.7.3.1 Sodiumdodecylsulfat (SDS)- Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)

Um Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes aufzutrennen wurden diese zunächst 1:1 (v/v) in reduzierendem Probenpuffer aufgenommen und für 5-10 min bei 95°C aufgeköcht um eine Denaturierung zu bewirken. Das im Probenpuffer enthaltene DTT reduziert zusätzlich Disulfidbrücken innerhalb der Proteine und unterstützt somit die Denaturierung. SDS sorgt für eine einheitliche negative Ladung der Proteine, was eine Auftrennung im elektrischen Feld nach Molekülmasse ermöglicht. Der Auftrennungsbereich ist abhängig von der Porengröße der Gelmatrix, und somit von der Polyacrylamid-Konzentration. In der Regel erfolgte die Auftrennung in einem 12%igen Polyacrylamidgel.

2.7.3.2 Western Blot Analysen

Um Proteine, die mittels SDS-Page aufgetrennt wurden, unter Zuhilfenahme von spezifischen Antikörpern sichtbar zu machen, wurden sie auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Dafür wurde eine in Transfer-Puffer getränkte Nitrozellulosemembran auf das SDS-Gel gelegt, und dieses Duo anschließend zwischen in Puffer getränkten Whatman - Filterpapiere gebettet und in eine Blot-Kammer überführt. Der Transfer erfolgte bei 1 mA/cm² für 1 Stunde. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran in Ponceau S Färbelösung inkubiert, um die Größenstandards sichtbar zu machen. Die angefärbte Membran wurde in PBS entfärbt und anschließend für 1 h bei 4°C in 4% Milchpulver/PBS inkubiert, um nicht gesättigte Bindungsstellen zu blockieren. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte in der Regel bei 4°C über Nacht. Nach mehrmaligem Waschen in PBS erfolgte die Inkubation mit dem *horseradish peroxidase* (HRP)-gekoppelten Zweitantikörper, in der Regel für 1,5 h bei 4°C. Nach erneutem mehrmaligem Waschen wurde die Membran für die anschließende HRP-Detektion kurzzeitig mit gebrauchsfertiger *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Lösung (ergänzt mit 0,01% H₂O₂) überschichtet. Die Antikörper-gekoppelte Peroxidase katalysiert währenddessen eine Lichtreaktion, welche im Anschluss auf einem Röntgenfilm abgebildet werden kann.

2.7.3.3 Pulse Chase Experimente

2.7.3.3.1 Radioaktive Markierung von neu synthetisierten Proteinen

Hochsynchrone Kulturen im späten Ringstadium wurden 2mal in Hungermedium (modifiziertes RPMI-1640 Medium ohne L-Methionin, L-Cystein, und L-Glutamin (Sigma), zusätzlich ergänzt mit 0,3 mg/ml L-Glutamin, 10% humanem Plasma A/Rh+, 200 µm Hypoxanthin, 100µg/ml Neomycin) gewaschen und anschließend für 1 Stunde in diesem weiter kultiviert. Die radioaktive Markierung erfolgte durch die Zugabe von 100 µCi/ml [³⁵S]-Methionin, -Cystein (Perkin Elmer) für 45 min. Das nicht verstoffwechselte [³⁵S]-Methionin, -Cystein wurde anschließend durch 3 maliges Waschen der Zellen in Standard-Medium entfernt. Gegebenenfalls wurden die Parasiten gleichmäßig auf 2 Kulturflaschen aufgeteilt, plus BFA [4 µg/ml (Sigma)] beziehungsweise minus BFA, und über einen Zeitraum von 4-8 Stunden unter Standardbedingungen weiterkultiviert. Zu jedem untersuchten Zeitpunkt wurden vergleichbare Zelläquivalente entnommen und direkt im Anschluss einer Saponin-Lyse und nachfolgender Immunpräzipitation unterzogen.

2.7.3.3.2 Immunpräzipitation

Die durch Saponin freigesetzten Parasiten wurden 2mal in gekühltem PBS/1 mM PMSF gewaschen und anschließend in 250 µl Lyse-Puffer (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5% NP40, 1% SDS, 1 mM PMSF, PIC 1:200) für 8 h bei 4°C lysiert. Das Zelllysate wurde anschließend für 30 Minuten bei 4°C abzentrifugiert (18.000 rpm, Mikro 22R) und der daraus resultierende Überstand wurde 1:1 (v/v) mit Verdünnungs-Puffer (10 mM Tris-Cl pH7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM PMSF, PIC 1:200) versetzt. Die Immunpräzipitation erfolgte durch die Zugabe von anti-GFP magnetischen Beads (MBL) und einer anschließenden Inkubation bei 4°C für 30-45 Minuten. Die magnetischen Beads wurden daraufhin mit Hilfe eines Magnetständers gesammelt und 3mal in gekühltem PBS/1 mM PMSF/PIC 1:200) gewaschen. Gebundene Proteine wurden durch 7-minütiges Aufkochen in reduzierendem SDS Probenpuffer eluiert, per SDS-Page aufgetrennt (2.7.3.1) und anschließend mittels Western Blot (2.7.3.2) oder Autoradiographie detektiert.

2.7.3.3.3 Vorbereitung von SDS Gelen für die Autoradiographie

Zunächst wurde das Gel für mindestens 2 h in Coomassie-Färbelösung inkubiert, um die Größenstandards im Gel sichtbar zu machen. Anschließend wurde das Gel in 20% Methanol/ddH₂O entfärbt, um nicht-proteingebundenes Coomassie aus der Gelmatrix zu entfernen. Um die Radioaktivität zu verstärken, erfolgte im Anschluss eine 1-stündige

Inkubation in Enhance (Perkin Elmer), gefolgt von einer 30 - 60 minütigen Inkubation in 10% PEG/1% Glycerol/ddH₂O, um das Gel zu konservieren. Anschließend wurde das Gel auf zwei Whatman-Filterpapiere gelegt, mit Frischhaltefolie abgedeckt und für 4-6 h unter Vakuum und Wärmezufuhr getrocknet (Slab Dryer 224). Das Belichten auf Fujifilm Super RX fand über einen Zeitraum von 10-25 Tagen bei -80 °C statt.

2.7.4 Fluoreszenzmikroskopie

2.7.4.1 *Live cell* Fluoreszenzmikroskopie

Für *live cell* Aufnahmen wurden infizierte Erythrozyten direkt aus der Kultur entnommen und für wenige Minuten mit Hoechst 33258 (10µg/ml) angefärbt, um eine Visualisierung der Parasiten DNA zu ermöglichen. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Zeiss Axio Observer, mit entsprechenden Filtersets und der Axiovision 4 Software.

2.7.4.2 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Für Immunfluoreszenz Aufnahmen wurden die infizierten Erythrozyten zunächst in PBS gewaschen und daraufhin in 1 ml 4% Paraformaldehyd/ 0,0075% Glutaraldehyd/ PBS (Tonkin et al., 2004) für 30 min bei 37°C fixiert. Die Zellen wurden per Zentrifugation gesammelt und daraufhin für 10 min. bei Raumtemperatur in PBS/0,1% Triton X-100/ 125 mM Glycin permeabilisiert. Anschließend wurde das Pellet für 10 min. bei Raumtemperatur in PBS/125 mM Glycin gewaschen und nachfolgend für 1 h bei Raumtemperatur in PBS/3% BSA geblockt. Alle Antikörper wurden in PBS/3% BSA verdünnt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach 3maligem Waschen in PBS für 10 min, wurden das Pellet für 2 h bei Raumtemperatur in der Zweitantikörperlösung inkubiert und abschließend 3 mal in PBS gewaschen, wobei im letzten Waschschrift Hoechst in einer Endkonzentration von 50 ng/ml zugegeben wurde. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Zeiss Axio Observer, mit entsprechenden Filtersets und der Axiovision 4 Software.

2.7.4.3 Bildbearbeitung

Als zvi gespeicherte Axiovision 4 Software Aufnahmen wurden zur Bildbearbeitung in ImageJ 1.43 importiert. Alle Bilder wurden in 8-bit konvertiert und Hintergrund optimiert. Es wurden keine Gamma-Anpassungen durchgeführt. Aufnahmen einzelner Filterset-Kanäle wurden gegebenenfalls übereinander gelegt. Bearbeitete Bilder wurden im TIF Format in Powerpoint

(Microsoft) exportiert und graphisch angeordnet. Die Bildpräsentation erfolgte gemäß den gängigen Empfehlungen (Rossner and Yamada, 2004).

3 Ergebnisse

Der Transport Zellkern-kodierter Proteine zum Apicoplasten von *P. falciparum* ist ein komplexer Vorgang, der in den letzten Jahren mit großem Interesse untersucht wurde. Während mittlerweile vieles offengelegt werden konnte, über Transport-vermittelnde Signale und Translokationskomponenten innerhalb der Plastide, ist noch immer weitestgehend unklar, wie Proteine zunächst vom ER zur äußeren Apicoplasten Membran gelangen. Die gegenwärtige Literatur favorisiert ein Modell, bei dem Apicoplast Proteine bereits im Lumen des ER erkannt und in ein spezielles vesikuläres System sortiert werden, über das sie auf direktem Weg und unter Ausschluss des Golgi-Apparates vom ER zur äußeren Apicoplasten Membran transportiert werden. Eine mögliche Beteiligung des Golgi-Apparates am Transport löslicher Apicoplast Proteine soll hier genauer untersucht werden. Dafür soll der Effekt C-terminaler ER *retrieval* Sequenzen auf die Lokalisierung, sowie auf die quantitative und dynamische Prozessierung Apicoplast-gerichteter Reporterproteine analysiert werden. Weiterhin sollen die Auswirkungen von Brefeldin A, einem potenten Inhibitor des sekretorischen Weges, auf die quantitative und dynamische Prozessierung eines Apicoplast-gerichteten Reporterproteins näher untersucht werden; auch vor dem Hintergrund einer BFA-resistenten *P. falciparum* Zelllinie.

3.1 C-terminale ER *retrieval* Sequenzen haben einen negativen Einfluss auf den Transport eines Reporterproteins zum Apicoplasten von *P. falciparum*.

Um eine mögliche Beteiligung des Golgi-Apparates am Proteintransport zum Apicoplasten von *P. falciparum* zu untersuchen, wurden transgene Parasiten hergestellt, die Apicoplast-gerichtete GFP-Fusionsproteine mit bzw. ohne zusätzliche C-terminalen ER *retrieval* Sequenzen exprimieren. Ähnlich wie in früheren Studien (Tonkin et al., 2006b) wurde dem die Überlegung zugrunde gelegt, dass im Falle eines Golgi-abhängigen Transportweges, die ER *retrieval* Sequenzen vom Golgi-residenten ERD2 Rezeptor erkannt werden. Dies führt zu einer Rücksendung der Reporterproteine zum ER des Parasiten, und somit zu einem verminderten zielgerichteten Transport zum Apicoplasten. Als Modell für ein Apicoplast-gerichtetes Protein wurde das gut beschriebene Transport-vermittelnde *bipartite topogenic signal* (BTS) des *Acyl Carrier Proteins* (ACP) verwendet. ACP ist ein hoch abundantes Apicoplast Protein, das an der Biosynthese von Fettsäuren in der Plastide beteiligt ist. Die BTS von ACP alleine ist ausreichend um Reporterproteine zum Apicoplasten zu dirigieren, und wird häufig als Modellprotein verwendet, um den Transport zum Apicoplasten zu

untersuchen (Foth et al., 2003; Tonkin et al., 2006b; van Dooren et al., 2002; Waller et al., 1998; Waller et al., 2000).

Die BTS von ACP (Basenpaare 1-183 der kodierenden Sequenz von PF3D7_0208500 [PlasmoDB]), wurde an GFP fusioniert und anschließend in *P. falciparum* transfiziert und exprimiert (ACP^{BTS}). Entsprechende Fusionskonstrukte wurden zusätzlich mit einer C-terminalen -KDEL bzw. -SDEL *ER retrieval* Sequenz markiert und ebenfalls in *P. falciparum* transfiziert (ACP^{BTS_K} bzw. ACP^{BTS_S}). Die so generierten *P. falciparum* Transfektantenlinien ACP^{BTS}, ACP^{BTS_K} und ACP^{BTS_S} wurden im Folgenden in Hinblick auf die intrazelluläre Lokalisierung und quantitative Prozessierung ihrer Reporterproteine analysiert. Der Effekt der C-terminalen ER *retrieval* Sequenzen wurde weiterhin im Kontext von zielgerichteten Mutationen in der BTS von ACP untersucht, sowie im Hinblick auf die dynamische Prozessierung der Reporterproteine im Vergleich zu Reporterproteinen ohne ER *retrieval* Sequenz.

3.1.1 Das Hinzufügen C-terminaler ER *retrieval* Sequenzen vermindert den Transport Apicoplast-gerichteter Reporterproteine zum Apicoplasten.

Um den Effekt C-terminaler ER *retrieval* Sequenzen auf die intrazelluläre Lokalisierung eines Apicoplast-gerichteten Reporterproteins zu untersuchen, wurden die Transfektantenlinien ACP^{BTS}, ACP^{BTS_K}, und ACP^{BTS_S} mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Eine schematische Darstellung der verwendeten Transfektionskonstrukte unter Kontrolle des PfCRT-Promotors ist in Abbildung 3.1 A gezeigt. *Live cell* Aufnahmen der generierten Parasitenlinien (Abb. 3.2 B) zeigen, dass die BTS von ACP in der Lage ist das Reporterprotein zum Apicoplasten zu dirigieren, was an einem punktförmigen Fluoreszenzsignal der ACP^{BTS} Parasiten zu erkennen ist, welches für eine Apicoplast-Lokalisierung typisch ist (obere Reihe). Bei Parasiten der ACP^{BTS_K} Zelllinie ist zusätzlich eine verstärkte Fluoreszenz in der Peripherie des Zellkerns zu beobachten, welche auf eine teilweise Rücksendung der Reporterproteine zum ER des Parasiten hindeutet (mittlere Reihe). Das Hinzufügen einer -SDEL ER *retrieval* Sequenz führt in Parasiten der ACP^{BTS_S} Zelllinie zu einem Fluoreszenzsignal, welches ausschließlich den Zellkern des Parasiten umgibt, was auf eine Lokalisierung des Reporterproteins im ER hinweist (untere Reihe).

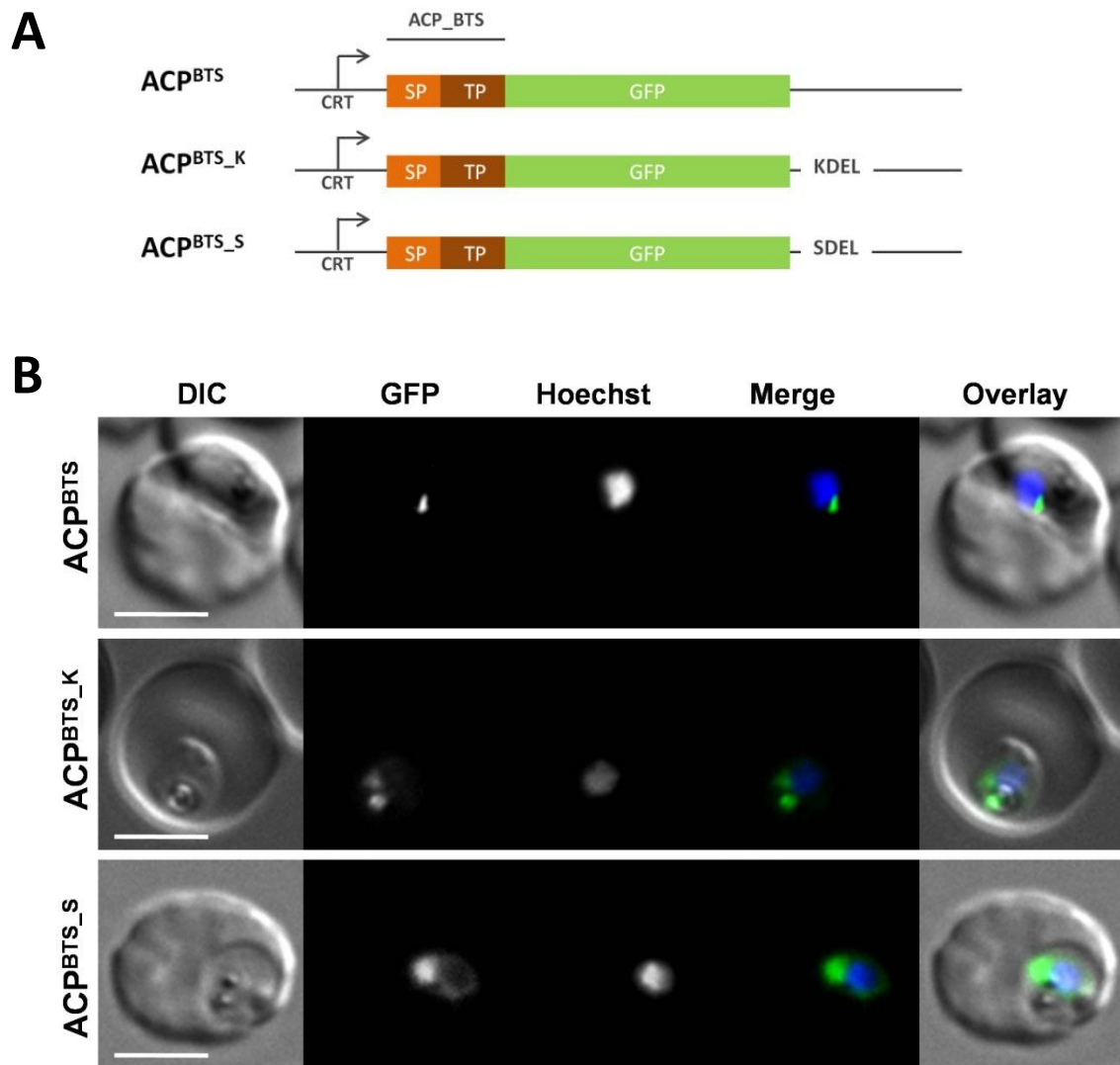
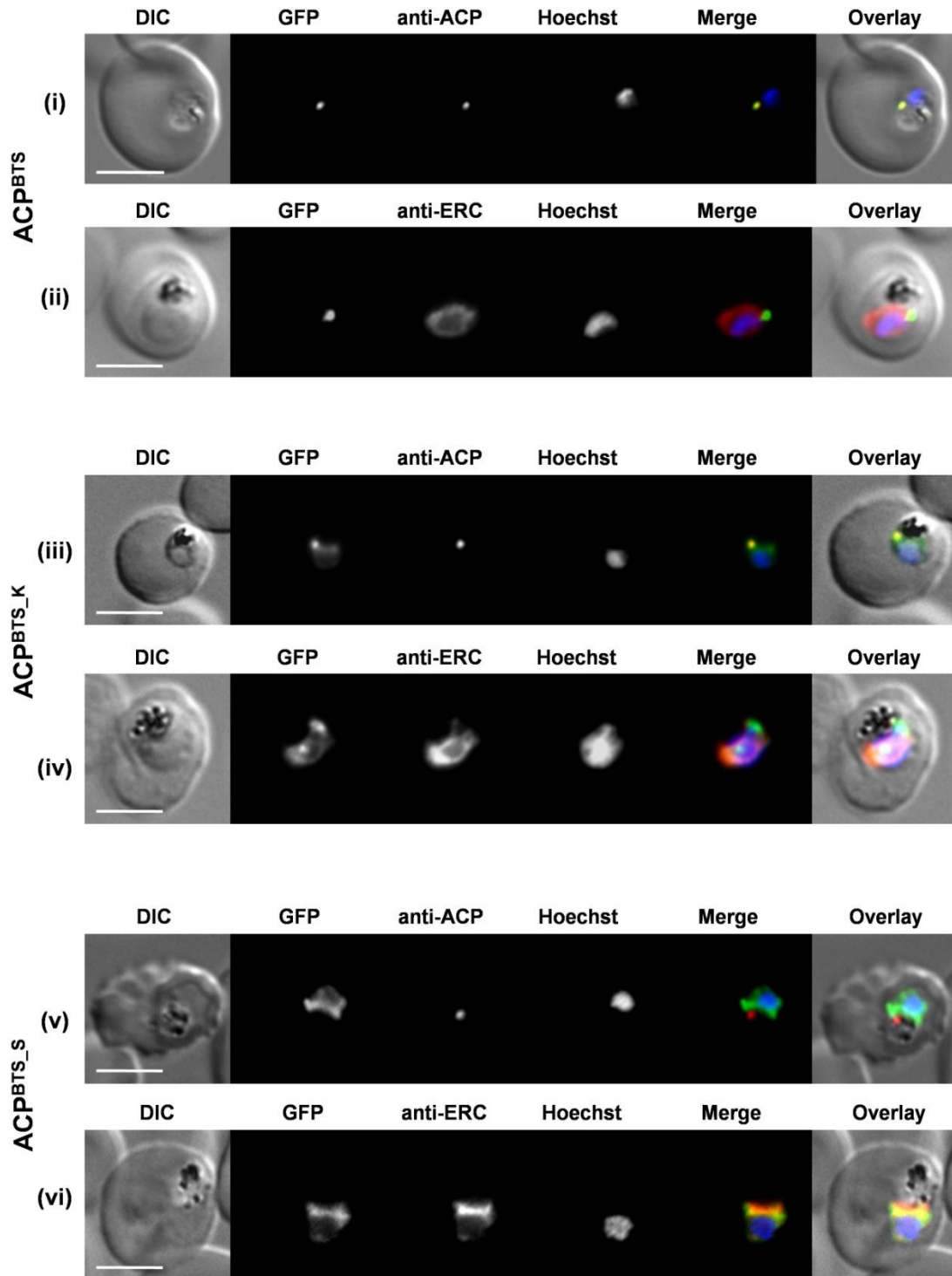


Abb. 3.1: Live cell Aufnahmen der ACP^{BTS}, ACP^{BTS_K} und ACP^{BTS_S} Parasitenlinien.

A) Schematische Darstellung der verwendeten Transfektionskonstrukte unter Kontrolle des PfCRT Promotors. Basenpaare 1-183 von ACP (PlasmoDB:PF3D7_0208500) wurden an GFP fusioniert. Signalpeptid (SP) in orange, Transitpeptid (TP) in braun, GFP in grün. Zusätzliche C-terminale ER *retrieval* Sequenz -KDEL bzw. -SDEL in schwarz. B) *Live cell* Aufnahmen der generierten *P. falciparum* Transfektantenlinien. Infizierte Erythrozyten wurden direkt aus der Kultur entnommen und mit Hoechst angefärbt, um eine Visualisierung der Parasiten-DNA zu ermöglichen. ACP^{BTS} Parasiten zeigen ein punktförmiges Fluoreszenzsignal, indikativ für eine Apicoplast-Lokalisierung des Reporterproteins (obere Reihe). Das Hinzufügen einer C-terminalen ER *retrieval* Sequenz zum Reporterprotein, führt zu einem Fluoreszenzsignal, das verstärkt (mittlere Reihe, -KDEL) bzw. ausschließlich (untere Reihe, -SDEL) in der Peripherie des Zellkerns lokalisiert, was auf eine Rücksendung der Reporterproteine zum ER des Parasiten hindeutet. DIC: Differentialinterferenzkontrast; Merge: GFP Signal (grün) und Hoechst Signal (blau); Overlay: DIC und Merge. Größenstandard: 3 μ m.

Abb. 3.2: Co-Lokalisierung der Reporterproteine der ACP^{BTS} , ACP^{BTS_K} und ACP^{BTS_S} Parasiten mit dem Apicoplast Marker ACP und dem ER Marker ERC.

Endogenes ACP (Apicoplast Marker) bzw. ERC (ER Marker) der transgenen Parasiten wurde mit spezifischen Antikörpern immundetektiert und über Cy3-gekoppelte Zweitantikörper visualisiert. Das Reporterprotein der ACP^{BTS} Parasiten co-lokalisiert mit endogenem ACP (i), nicht aber mit dem ER Marker ERC (ii). Bei Parasiten der ACP^{BTS_K} Transfektantenlinie ist eine Übereinstimmung des GFP-Fluoreszenzsignals sowohl mit dem Apicoplast Marker ACP (iii), als auch mit dem ER Marker ERC (iv) zu erkennen. Das Reporterprotein der ACP^{BTS_S} Parasiten co-lokalisiert nicht mit endogenem ACP (v), sondern ausschließlich mit dem ER Marker ERC (vi). DIC: Differentialinterferenzkontrast; Merge: GFP Signal (grün), Hoechst Signal (blau) und ACP bzw. ERC Signal (rot); Overlay: DIC und Merge. Größenstandard: 3 μm .



Immunfluoreszenz Aufnahmen mit Antikörpern gegen das endogene ACP (Waller et al., 1998) und das ER Marker Protein ERC (La Greca et al., 1997), bestätigen die in *live cell* Aufnahmen beobachtete intrazelluläre Lokalisierung der Reporterproteine (Abb. 3.2). Das GFP-Fluoreszenzsignal der ACP^{BTS} Parasiten stimmt mit dem Signal des Apicoplast Markers ACP überein, während keine Co-Lokalisierung mit dem ER Marker ERC detektiert werden kann (Abb. 3.2 i, ii). Bei Parasiten der ACP^{BTS_K} Zelllinie kann eine Übereinstimmung der Reporterprotein Fluoreszenz sowohl mit dem Apicoplast Marker ACP, als auch mit dem ER Marker ERC beobachtet werden (Abb. 3.2 iii, iv). Das Reporterprotein der ACP^{BTS_S} Zelllinie hingegen co-lokalisiert ausschließlich mit dem ER Marker ERC. Eine Übereinstimmung des GFP-Fluoreszenzsignals mit dem Apicoplast Marker ACP kann nicht beobachtet werden (Abb. 3.2 v, vi). Dies deutet darauf hin, dass C-terminale ER *retrieval* Sequenzen den Transport eines Reporterproteins zum Apicoplasten unterschiedlich stark negativ beeinflussen.

3.1.2 Das Hinzufügen C-terminaler ER *retrieval* Sequenzen führt zu einer reduzierten Prozessierung Apicoplast-gerichteter Reporterproteine.

Der Transport von Apicoplast Proteinen zur Plastide von *P. falciparum* wird von einem N-terminalen *bipartite topogenic signal* (BTS) vermittelt, welches sich aus einem Signalpeptid für die co-translationale Insertion ins ER, und einem nachfolgendem Transitpeptid für den weiteren Transport zum und in den Apicoplasten zusammensetzt (Waller et al., 1998; Waller et al., 2000). Nach erfolgreichem Import in die Plastide, werden Transitpeptide von einer Apicoplast-residenten Peptidase gespalten und das reife Protein ins Lumen der Plastide entlassen (van Dooren et al., 2002; Waller et al., 1998). Diese Prozessierung kann als ein Maß für den erfolgreichen Transport von Apicoplast Proteinen zu ihrer Zieldestination herangezogen werden. Die Schnittstelle der Signalpeptidase für die co-translationale Abspaltung des Signalpeptids, sowie die vorhergesagte Transitpeptid Schnittstelle für die Prozessierung im Inneren der Plastide, ist im Falle des *Acyl Carrier Proteins* (ACP) bekannt (van Dooren et al., 2002). Beim hier verwendeten Reporterprotein, bestehend aus den ersten 61 Aminosäuren von ACP fusioniert an GFP, führt dies zu einer berechneten molekularen Masse von 32 kDa vor Prozessierung, und ca. 29 kDa nach Prozessierung im Apicoplasten (Abb. 3.3 A).

Um den Einfluss C-terminaler ER *retrieval* Sequenzen auf die Prozessierung der Reporterproteine, und damit ihren Transport zum/in den Apicoplasten, zu untersuchen, wurden Western Blot Analysen mit allen drei generierten Transfektantenlinien ACP^{BTS}, ACP^{BTS_K} und ACP^{BTS_S} durchgeführt. Dafür wurden Zelllysate Saponin-isolierter Parasiten per SDS-Page aufgetrennt und die Proteine mit anti-GFP Antikörpern immundetektiert (Abb.

3.3 B). Die kodierende Sequenz von GFP alleine, sowie die kodierende Sequenz des prozessierten ACP Transitpeptids fusioniert an GFP wurde in *E. coli* exprimiert und zum Größenvergleich ebenfalls per SDS-Page aufgetrennt und immundetektiert (Abb. 3.3 B Control)

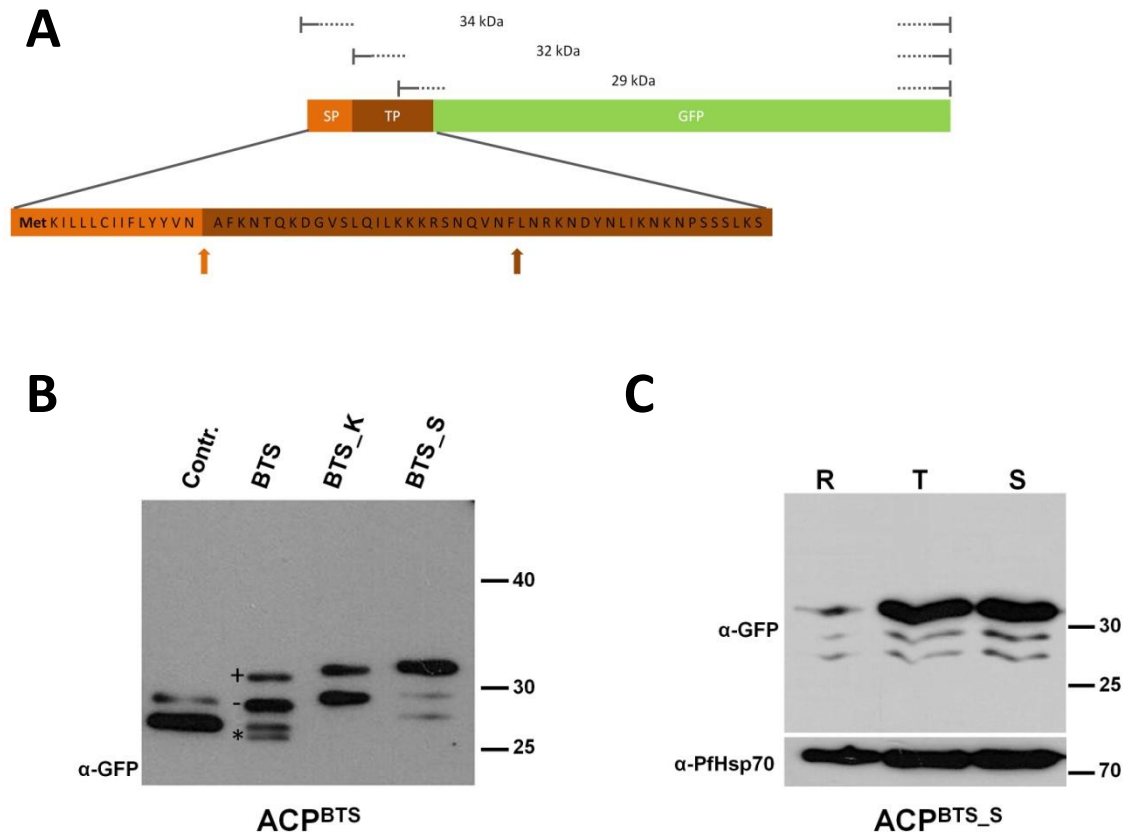


Abb. 3.3: Prozessierung der Reporterproteine der ACP^{BTS}, ACP^{BTS_K} und ACP^{BTS_S} Transfektanten.

(A) Schematische Darstellung des ACP_{BTS} Reporterproteins und seiner jeweiligen berechneten molekularen Masse nach sequenziellen Prozessierungsschritten. Das berechnete Molekulargewicht des Reporterproteins beträgt ca. 34 kDa. Nach co-translationaler Abspaltung des Signalpeptids (SP) im ER beträgt die berechnete molekulare Masse des unprozessierten Reporterproteins ca. 32 kDa. Nach erfolgreichem Import in den Apicoplasten und anschließender Prozessierung des Transitpeptids (TP) beträgt das berechnete Molekulargewicht des prozessierten Reporterproteins ca. 29 kDa. Die Berechnungen erfolgten ohne Berücksichtigung der C-terminalen ER *retrieval* Sequenzen und anhand der vorhergesagten Schnittstellen von van Dooren et al. (2002). (B) Western Blot Analysen der ACP^{BTS}, ACP^{BTS_K} und ACP^{BTS_S} Parasitenlinien mit anti-GFP Antikörpern. Die Proteine Saponin-isolierte Parasiten wurden per SDS-Page aufgetrennt und mittels Western Blot immundetektiert. Unprozessierte Reporterproteine (+) und prozessierte Reporterproteine (-) sind in allen drei analysierten Transfektantenlinien detektierbar. Ebenfalls erkennbar sind häufig beobachtete GFP-Degradationsprodukte (*). Die Mehrzahl der Reporterproteine der ACP^{BTS} Parasitenlinie wurde erfolgreich prozessiert (-). Bei Parasiten der ACP^{BTS_K} Zelllinie kann eine partielle Prozessierung der Reporterproteine detektiert werden, während die Mehrzahl jedoch nicht prozessiert wurde. Das Hinzufügen einer C-terminalen -SDEL Sequenz führt zu fast ausschließlich unprozessiertem Reporterprotein in ACP^{BTS_S} Parasiten. Control.: in *E. coli* exprimiertes prozessiertes ACP Transitpeptid fusioniert an GFP (obere Bande) und GFP alleine (untere Bande). Größenstandard in kDa. (C) Prozessierung des Reporterproteins der ACP^{BTS_S} Parasiten über einen Entwicklungszyklus hinweg. Parasiten im frühen Ringstadium (R), mittleren Trophozoiten- (T) und späten Schizontenstadium (S) wurden mit Saponin aus den Erythrozyten isoliert und anschließend lysiert. Zu jedem Zeitpunkt wurden gleiche Zelläquivalente per SDS-Page aufgetrennt und die Proteine mittels Western Blot mit anti-GFP Antikörpern bzw. anti-Hsp70 Antikörpern immundetektiert. Die quantitative Prozessierung des Reporterproteins ist unabhängig vom Entwicklungsstadium der Parasiten. Das relative Verhältnis von unprozessiertem zu prozessiertem Protein bleibt unverändert. Größenstandard in kDa.

Bei allen drei analysierten Transfektantenlinien sind mehrere Banden unterschiedlichen Molekulargewichts erkennbar. Die beiden oberen Banden entsprechen vermutlich dem unprozessierten (+) und prozessierten (-) Reporterprotein. Die unteren Banden (*) repräsentieren vermutlich häufiger beobachtete GFP-Abbauprodukte (Foth et al., 2003; Tonkin et al., 2006b). Die Mehrzahl der Reporterproteine von ACP^{BTS} Parasiten kann in prozessierter Form (-) detektiert werden, was einen erfolgreichen Transport dieser Proteine zum Apicoplasten suggeriert. In Übereinstimmung mit den fluoreszenzmikroskopischen Analysen (Abb. 3.2), findet bei ACP^{BTS-K} Parasiten eine partielle Prozessierung der Reporterproteine statt, während in Zelllysaten der ACP^{BTS-S} Parasiten fast ausschließlich unprozessiertes Reporterprotein detektierbar ist. Um auszuschließen, dass die fehlende Prozessierung dieser Reporterproteine vom Entwicklungsstadium der ACP^{BTS-S} Parasiten abhängig ist, wurde die Prozessierung über einen kompletten Entwicklungszyklus der Parasiten hinweg analysiert (Abb. 3.3 C). Zu jedem Zeitpunkt wurden gleiche Zelläquivalente entnommen und die aufgetrennten Proteine über Western Blot mit anti-GFP Antikörpern immunodetektiert. Das hoch abundante *P. falciparum* heat shock protein 70 (PfHsp70) dient als Ladekontrolle. In allen drei untersuchten Stadien, vom frühen Ringstadium (R) über das Trophozoiten- (T) zum späten Schizontenstadium (S), ist die Mehrzahl der detektierten Proteine nicht prozessiert. Das relative Verhältnis von unprozessiertem zu prozessiertem Protein bleibt dabei über den Entwicklungszyklus hinweg unverändert.

C-terminale ER *retrieval* Sequenzen reduzieren die quantitative Prozessierung Apicoplast-gerichteter Reporterproteine. Dies deutet darauf hin, dass der zielgerichtete Transport von Apicoplast Proteinen eine Passage durch den Golgi-Apparat miteinschließt. Wie schon bei Immunfluoreszenz Aufnahmen (Abb. 3.2) beobachtet, wird der Proteintransport zum Apicoplasten, von einer -SDEL ER *retrieval* Sequenz deutlich signifikanter beeinflusst als von einer C-terminalen -KDEL ER *retrieval* Sequenz (Abb. 3.3 B).

3.1.3 In Abwesenheit eines funktionellen Transitpeptids vermittelt eine –KDEL, wie eine –SDEL ER *retrieval* Sequenz, eine vollständige Rücksendung der Reporterproteine zum ER

ER *retrieval* Sequenzen werden im *cis*-Golgi vom ERD2 Rezeptor erkannt und über diesen zum ER zurückgeleitet (Elmendorf and Halder, 1993; Semenza et al., 1990). Die intrazelluläre Lokalisierung und Prozessierung eines Apicoplast-gerichteten Reporterproteins wird durch das Hinzufügen unterschiedlicher C-terminaler ER *retrieval* Sequenzen beeinträchtigt (Abb. 3.2, 3.3 B). Dies deutet daraufhin, dass das Reporterprotein über einen Zwischenschritt im Golgi-Kompartiment zur Plastide transportiert wird. Interessanterweise wird der Transport des Reporterproteins von einer -SDEL Sequenz fast komplett verhindert,

während -KDEL nur zu einer partiellen Reduktion des Transports führt (Abb. 3.2 B, 3.3 B). Dies könnte bedeuten, dass die -KDEL Sequenz generell ein weniger potentes ER *retrieval* Signal im Plasmodium System darstellt, als die -SDEL Sequenz. In früheren Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass sekretorische Proteine von *P. falciparum*, die über den *default* sekretorischen Weg zunächst in die PV und über die PVM hinweg ins Zytosol der Wirtszelle sekretiert werden, von einer C- terminalen -KDEL Sequenz effektiv und vollständig im ER des Parasiten zurückgehalten werden können (Külzer et al., 2009; Przyborski et al., 2005).

Der Golgi-Apparat ist üblicherweise das Kompartiment, in dem Proteine mit unterschiedlichen sekretorischen Destinationen erkannt und in ihre entsprechenden Transportsysteme sortiert werden. Unter der Annahme, dass Transitpeptide Apicoplast-lokalisierter Proteine ebenfalls von einem hypothetischen, bislang unbekannten Rezeptor im Golgi erkannt werden, würde dies bedeuten, dass im artifiziell erzeugten Modellsystem von "Apicoplast *targeting* Signal vs. ER *retrieval* Signal" zwei gegensätzliche *targeting* Signale im selben Kompartiment mit einander in Konflikt geraten. Dabei stehen die beiden unterschiedlichen Rezeptoren in direkter Konkurrenz zueinander, und die endgültige Lokalisierung des Reporterproteins ist abhängig von der relativen Affinität der jeweiligen Signale zu ihren Rezeptoren. Im Falle der hier beobachteten unterschiedlichen Auswirkungen von -SDEL und -KDEL auf die Apicoplast-Lokalisierung / Prozessierung des Reporterproteins (Abb. 3.2, 3.3 B), würde dies bedeuten, dass -SDEL eine höhere Affinität zum ERD2 Rezeptor besitzt, als das Transitpeptid des Reporterproteins zum hypothetischen Transitpeptid Rezeptor. Die -KDEL Sequenz hingegen hat eine vergleichbare Affinität zum ERD2 Rezeptor, wie das Transitpeptid zum hypothetischen Transitpeptid Rezeptor, was in einer partiellen ER-, sowie in einer partiellen Apicoplast-Lokalisierung des Reporterproteins resultiert. Bei Reporterproteinen ohne konkurrierendes *targeting* Signal sollten -KDEL und -SDEL ER *retrieval* Signale folglich äquivalent agieren. Um dies im Kontext des hier verwendeten Reporterproteins experimentell zu bestätigen, wurde der Effekt der beiden C-terminalen ER *retrieval* Sequenzen auf die Lokalisierung des ACP_BTS Reporterproteins ohne funktionelles Transitpeptid untersucht. Dafür wurden Transfektanten generiert, deren Reporterproteine nur die ersten 20 Aminosäuren von ACP, entsprechend dem vorhergesagten Signalpeptid (van Dooren et al., 2002), umfassen (ACP^{SP}, ACP^{SP-K} und ACP^{SP-S}). Frühere Studien haben bereits gezeigt, dass das Signalpeptid von ACP ausreichend ist, um ein Reporterprotein in den *default* sekretorischen Weg einzuleiten und in die PV zu sekretieren (Tonkin et al., 2006b).

Die generierten Transfektantenlinien exprimieren ein Reporterprotein der erwarteten Größe (Abb. 3.4), welches mit der molekularen Masse von bakteriell exprimierten GFP

übereinstimmt. Bei ACP^{SP} Parasiten (linke Spalte) sind zudem GFP Degradationsprodukte detektierbar.

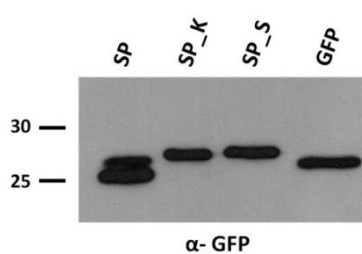


Abb. 3.4: Immundetektion der Reporter-proteine der ACP^{SP}, ACP^{SP_K} und ACP^{SP_S} Parasiten.

Western Blot Analysen der ACP^{SP}, ACP^{SP_K} und ACP^{SP_S} Transfektantenlinien. Die Zelllysate Saponin-isolierter Parasiten wurden per SDS-Page aufgetrennt und mit anti-GFP Antikörpern immundetektiert. Proteine der erwarteten molekularen Masse sind erkennbar. Bei ACP^{SP} Parasiten sind zudem GFP-Degradationsprodukte zu beobachten. GFP: in *E. coli* exprimiertes GFP. Größenstandard in kDa.

Die intrazelluläre Lokalisierung der Reporterproteine wurde anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt (Abb. 3.5). *Live cell* Aufnahmen der ACP^{SP} Zelllinie zeigen ein starkes den Parasiten umgebendes Signal (Abb. 3.5 A, obere Reihe), welches in Immunfluoreszenz Aufnahmen mit dem PV Marker SERP co-lokalisiert (Abb. 3.5 A, untere Reihe). Die Reporterproteine dieser Parasiten werden in die PV sekretiert. Das Hinzufügen einer C-terminalen ER *retrieval* Sequenz führt bei beiden generierten Parasitenlinien ACP^{SP_K} und ACP^{SP_S} zu einer vollständigen Retention der Reporterproteine im ER des Parasiten (Abb. 3.5 B, C). Das GFP-Fluoreszenzsignal beider Zelllinien co-lokalisiert mit dem ER Marker ERC. Eine Sekretion in die PV kann weder bei -KDEL, noch bei -SDEL getaggten Reporterproteinen beobachtet werden. Dies spricht dafür, dass die -KDEL ER *retrieval* Sequenz, in Abwesenheit eines funktionellen Transitpeptids, im Golgi effizient erkannt wird und eine vollständige Rücksendung der Reporterproteine zum ER vermitteln kann.

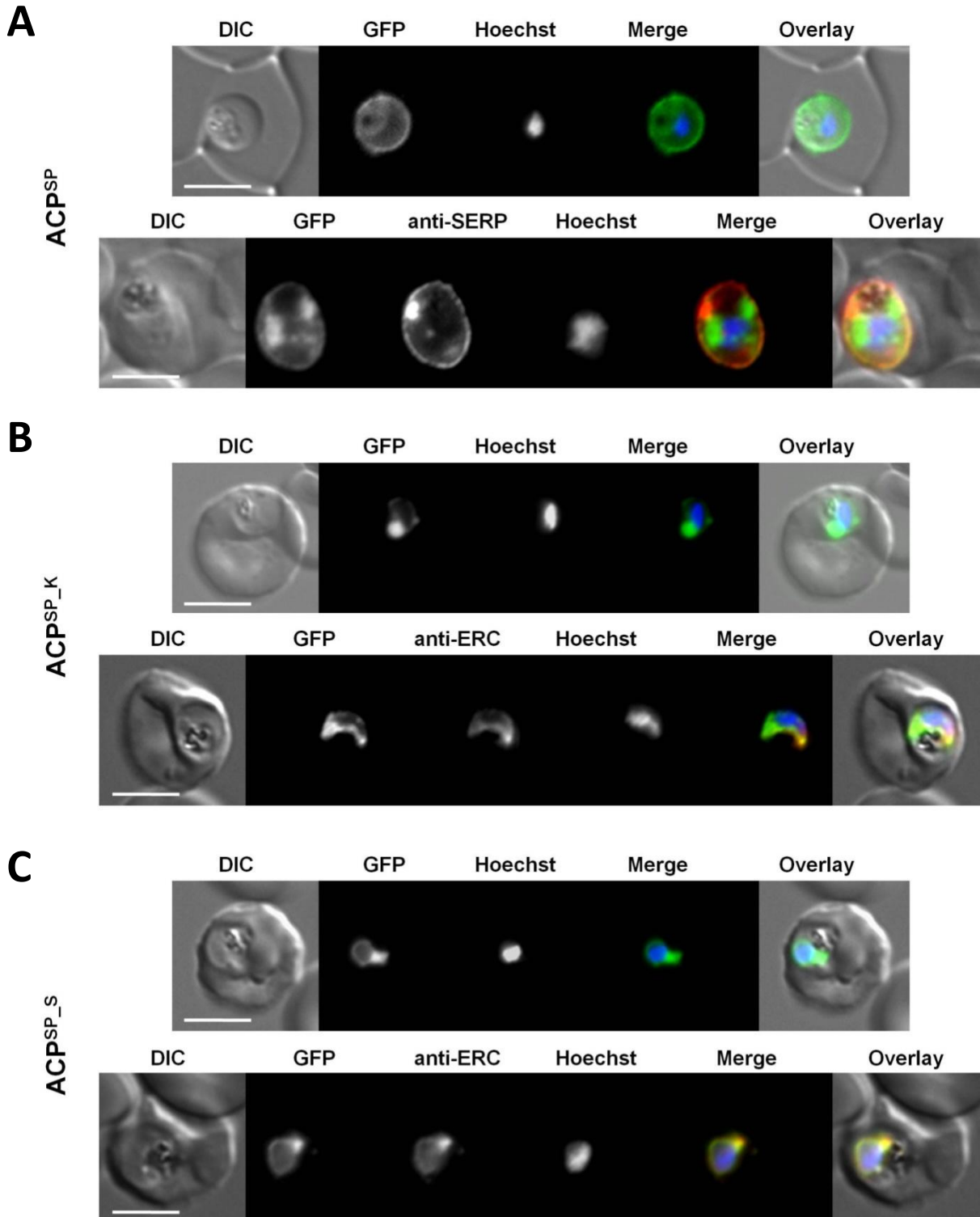


Abb. 3.5: Intrazelluläre Lokalisierung der Reporterproteine der ACP^{SP}, ACP^{SP_K} und ACP^{SP_S} Parasitenlinien.

(A) *Live cell* Aufnahmen der ACP^{SP} Parasiten zeigen ein starkes den Parasiten umgebendes Fluoreszenzsignal (obere Reihe), welches mit dem immundetektierten PV Marker SERP übereinstimmt (untere Reihe). (B) *Live cell* Aufnahmen der ACP^{SP_K} Parasiten zeigen ein Fluoreszenzsignal in der Peripherie des Zellkerns (obere Reihe), welches mit dem ER Marker ERC co-lokalisiert (untere Reihe). (C) *Live cell* Aufnahmen der ACP^{SP_S} Parasiten (obere Reihe) zeigen ein Fluoreszenzsignal, das den Zellkern umschließt und mit dem ER Marker ERC überlappt (untere Reihe). DIC: Differentialinterferenzkontrast; Merge: GFP Signal (grün) und Hoechst Signal (blau) in *live cell* Aufnahmen; GFP Signal (grün), Hoechst Signal (blau) und SERP, bzw. ERC Signal (rot) in Immunfluoreszenzen; Overlay: DIC und Merge. Größenstandard: 3 μ m.

3.1.4 Die -KDEL vermittelte Redistribution des Reporterproteins zum ER steigt mit abnehmender Stärke des Transitpeptids

In Kombination mit einem funktionellen Transitpeptid, können die beiden ER *retrieval* Sequenzen -KDEL bzw. -SDEL den Transport eines Apicoplast-gerichteten Reporterproteins unterschiedlich stark negativ beeinflussen (Abb. 3.2, 3.3 B). In Abwesenheit eines funktionellen Transitpeptids hingegen, wird von beiden Sequenzen eine effiziente und vollständige Rücksendung der Reporterproteine zum ER des Parasiten vermittelt (Abb. 3.5). Frühere Studien haben gezeigt, dass durch zielgerichtete Mutagenese einzelner positiv geladener Aminosäuren im Transitpeptid von ACP, der Transport zum Apicoplasten unterschiedlich stark beeinträchtigt werden kann (Foth et al., 2003). Eine Mutation an Position 22 (K22E) führt zu einem abgeschwächten Transitpeptid, das den Transport zum Apicoplasten nur noch teilweise vermitteln kann. Eine Lysin zu Glutaminsäure Substitution an Position 18 (K18E), resultiert in einem nahezu funktionsunfähigen Transitpeptid, was eine fast vollständige Sekretion des Proteins in die PV zu Folge hat (Foth et al., 2003). Entsprechend unserer Hypothese wird die endgültige Lokalisierung eines Reporterproteins mit gegensätzlichen *targeting* Informationen über die relative Affinität der jeweiligen Signale zu ihren Rezeptoren bestimmt. Um diese Hypothese weiter auszubauen, wurden die im Kontext eines konkurrierenden Transitpeptids unterschiedlich effizienten ER *retrieval* Signale gegen mutierte Transitpeptide unterschiedlicher Effizienz titriert. Dafür wurden weitere transgene Parasitenlinien generiert, die verschiedene Kombinationen aus "starken/schwachen" Transitpeptiden und "starken/schwachen" ER *retrieval* Signalen exprimieren.

Zunächst wurde die von Foth und Kollegen beschriebene "schwache" (K22E) und "starke" (K18E) Mutation des Transitpeptids von ACP in unserem System verifiziert. Dafür wurden transgene Parasiten, mit den entsprechenden Mutationen im Reporterprotein (ACP^{K22E} bzw. ACP^{K18E}) fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abb. 3.6). In Übereinstimmung mit früheren Daten (Foth et al., 2003), kann bei ACP^{K22E} Transfektanten ein Apicoplast-typisches Fluoreszenzsignal beobachtet werden, das mit dem Signal des Apicoplast Markers ACP übereinstimmt. Zudem ist eine den Parasiten umschließende Fluoreszenz detektierbar, was auf eine teilweise Sekretion des Reporterproteins in die PV hindeutet (Abb. 3.6 A). Im Gegensatz dazu ist bei Parasiten mit der "starken" K18E Mutation eine Fluoreszenz fast ausschließlich in der Peripherie des Parasiten zu erkennen, was auf eine nahezu vollständige Sekretion des Reporterproteins in die PV hinweist. Eine Co-Lokalisierung mit dem Apicoplast Marker ACP ist nicht detektierbar (Abb. 3.6 B). Nur in seltenen Ausnahmefällen konnte eine geringfügige partielle Co-Lokalisierung der Reporterproteine mit dem Apicoplast Marker ACP beobachtet werden.

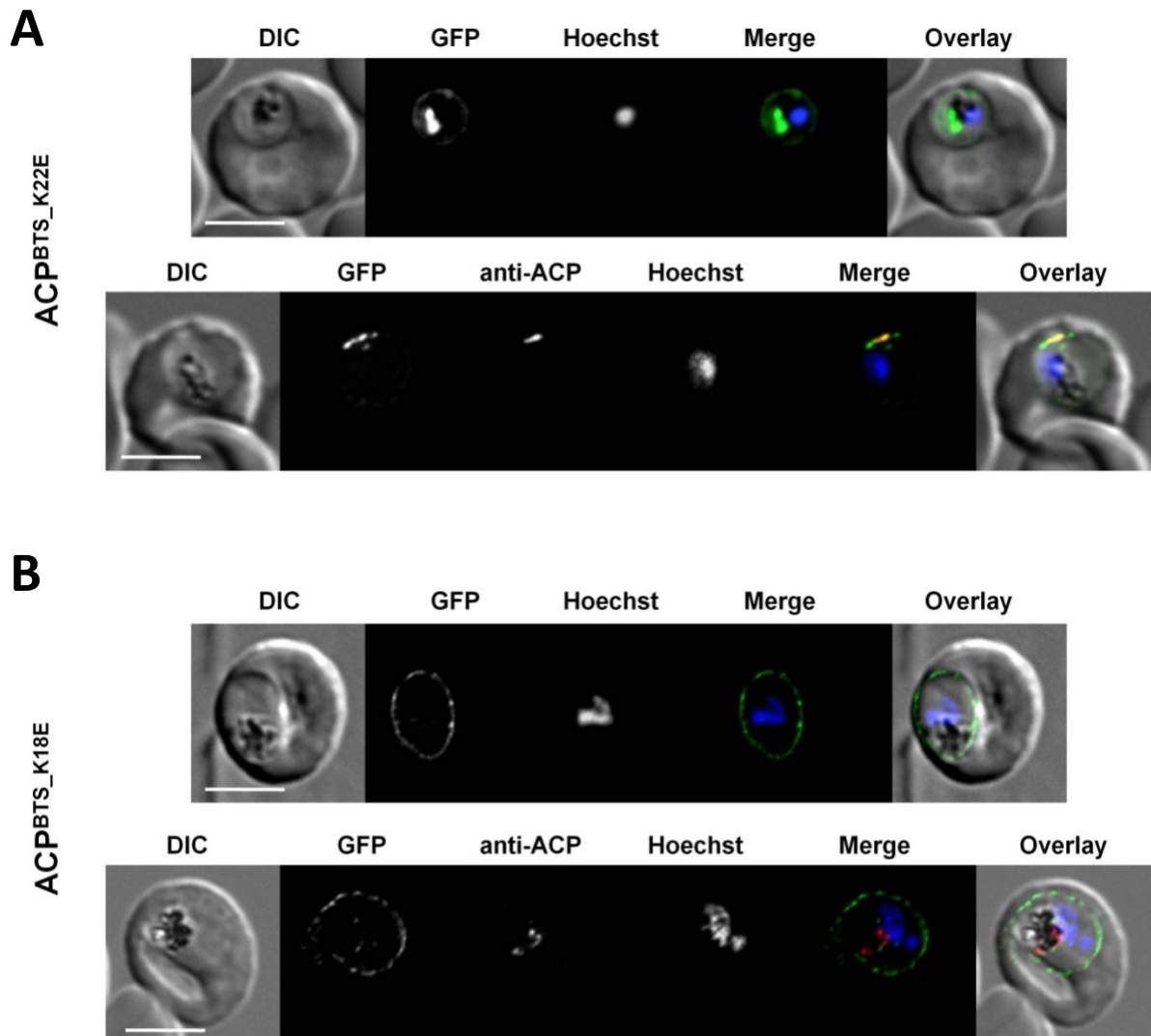


Abb. 3.6: Einfluss der zielgerichteten Mutagenese von K22 und K18 im Transitpeptid von ACP auf die intrazelluläre Lokalisierung des Reporterproteins.

Das Transitpeptid von ACP wurde gemäß früherer Studien (Foth et al., 2003) entweder an Position 22 (K22E) oder an Position 18 (K18E) zielgerichtet mutiert. Die entsprechend mutierte BTS von ACP wurde an GFP fusioniert und in *P. falciparum* transfiziert. (A) *Live cell* Aufnahmen der ACP^{K22E} Parasitenlinie zeigen ein den Parasiten umschließendes GFP-Fluoreszenzsignal, indikativ für eine Sekretion des Reporterproteins in die PV, sowie ein dominantes Apicoplast-ähnliches Signal (obere Reihe), welches in Immunfluoreszenz Aufnahmen als Apicoplast verifiziert werden kann (untere Reihe). (B) In Parasiten der ACP^{K18E} Zelllinie ist in *live cell* Aufnahmen ein deutliches Fluoreszenzsignal in der Peripherie des Parasiten erkennbar, das eine Sekretion der Reporterproteine in die PV signalisiert (obere Reihe). Eine Lokalisierung der Reporterproteine im Apicoplasten ist nicht detektierbar (untere Reihe). DIC: Differentialinterferenzkontrast; Merge: GFP Signal (grün) und Hoechst Signal (blau) in *live cell* Aufnahmen; GFP Signal (grün), Hoechst Signal (blau) und ACP Signal (rot) in Immunfluoreszenzen; Overlay: DIC und Merge. Größenstandard: 3 µm.

Anschließend wurden die mutierten Transitpeptide in Kombination mit dem "schwachen" (-KDEL) oder "starken" (-SDEL) ER *retrieval* Signal exprimiert, und die so generierten Transfektantenlinien in Hinblick auf die Lokalisierung und Prozessierung der Reporterproteine analysiert. Abgeschwächte Transitpeptide (K22E) in Kombination mit dem "schwachen" -KDEL ER *retrieval* Signal (ACP^{K22E-K}) führen zu einem Fluoreszenzsignal der Reporterproteine, welches hauptsächlich mit dem ER Marker ERC co-lokalisiert, wobei bei einigen Parasiten auch eine partielle Übereinstimmung mit dem Apicoplast Marker ACP

detektierbar ist (Abb. 3.7 A). Das Hinzufügen der "starken" -SDEL ER *retrieval* Sequenz hingegen (ACP^{K22E-S}) hat eine vollständige Redistribution der Reporterproteine zum ER des Parasiten zur Folge. Eine Übereinstimmung der GFP-Fluoreszenzsignale mit dem ACP Marker ACP ist nicht erkennbar, während eine Co-Lokalisierung mit dem ER Marker ERC eindeutig detektiert werden kann (Abb. 3.7 B).

Die "starke" K18E Mutation führt zu einem funktionsunfähigen Transitpeptid, das nicht mehr als solches erkannt werden kann, und eine Sekretion des Reporterproteins in die PV des Parasiten zur Folge hat (Abb. 3.6 B; (Foth et al., 2003). In Kombination mit dem "schwachen" -KDEL ER *retrieval* Signal (ACP^{K18E-K}) kann eine Lokalisierung der Reporterproteine vorwiegend im ER des Parasiten detektiert werden. Eine Übereinstimmung des Fluoreszenzsignals mit dem Apicoplast Marker ACP ist nicht erkennbar. Ein geringfügiger Teil der Reporterproteine wird jedoch nach wie vor in die PV sekretiert, was an dem schwachen den Parasiten umgebenden Fluoreszenzsignal deutlich wird (Abb. 3.8 A). Das Hinzufügen der "starken" -SDEL ER *retrieval* Sequenz (ACP^{K18E-S}) resultiert auch hier in einer vollständigen Rücksendung der Reporterproteine zum ER des Parasiten. Weder eine Sekretion in die PV, noch ein Transport zum Apicoplasten kann fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden (Abb. 3.8 B).

Western Blot Analysen der generierten Transfektantenlinien mit anti-GFP Antikörpern (Abb. 3.9), bestätigen die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen. Reporterproteine mit der "schwachen" K22E Mutation werden zu einem gewissen Teil prozessiert. Diese Prozessierung kann von einem "schwachen" -KDEL ER *retrieval* Signal reduziert werden, während sie vom "starken" -SDEL *retrieval* Signal komplett verhindert wird. Bei Parasiten mit der "starken" K18E Mutation, kann nur ein minimaler Anteil der Reporterproteine in prozessierter Form detektiert werden. Das Hinzufügen der beiden ER *retrieval* Sequenzen führt in beiden Fällen zum Ausbleiben einer quantifizierbaren Prozessierung. Bei den meisten der analysierten Transfektantenlinien sind, wie schon zuvor, verschiedene GFP Degradationsprodukte detektierbar; die von Parasitenlinie zu Parasitenlinie unterschiedliche Abundanz dieser Abbauprodukte kann jedoch nicht erklärt werden.

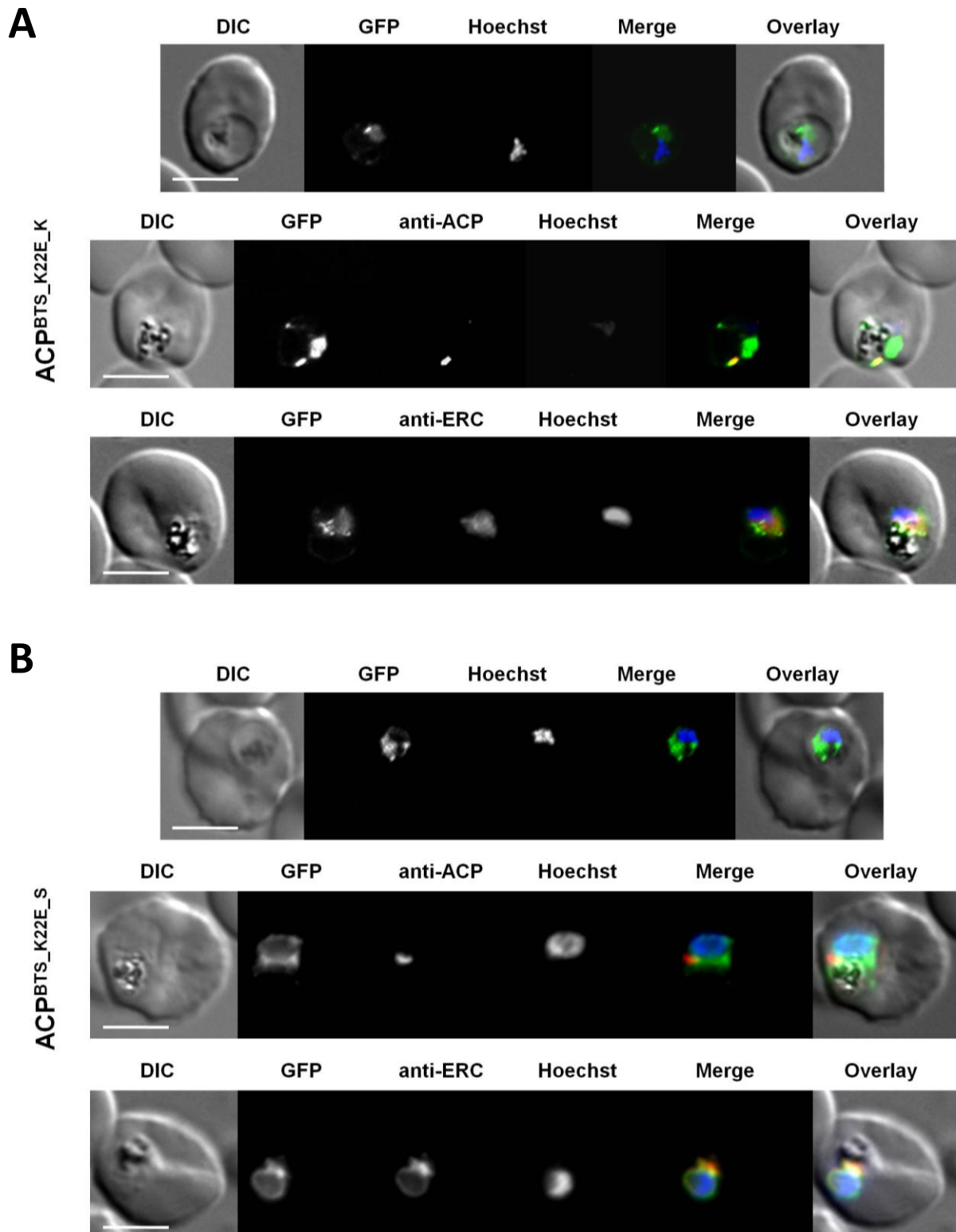


Abb. 3.7: Intrazelluläre Lokalisierung der K22E mutierten Reporterproteine in Abhängigkeit der C-terminalen ER retrieval Sequenzen -KDEL bzw. -SDEL.

(A) In *live cell* Aufnahmen der ACP^{K22E_K} Transfektanten (obere Reihe) ist ein Apicoplast-ähnliches GFP-Fluoreszenzsignal erkennbar, sowie ein deutliches Signal in der Peripherie des Zellkerns, was für eine ER Lokalisierung indikativ ist. Immunfluoreszenz Aufnahmen bestätigen eine Co-Lokalisierung der GFP-Fluoreszenz sowohl mit dem Apicoplast Marker ACP (mittlere Reihe), als auch mit dem ER Marker ERC (untere Reihe). (B) In lebenden Parasiten der ACP^{K22E_S} Zelllinie ist ein Fluoreszenzsignal ausschließlich in der Peripherie des Zellkerns zu erkennen. In Immunfluoreszenz Analysen kann keine Überlappung der GFP-Fluoreszenz mit dem Apicoplast Marker ACP detektiert werden (mittlere Reihe). Die GFP-Signale co-lokalisieren ausschließlich mit dem ER Marker ERC (untere Reihe). DIC: Differentialinterferenzkontrast; Merge: GFP Signal (grün) und Hoechst Signal (blau) in *live cell* Aufnahmen; GFP Signal (grün), Hoechst Signal (blau) und ACP bzw. ERC Signal (rot) in Immunfluoreszenzen; Overlay: DIC und Merge. Größenstandard: 3 µm.

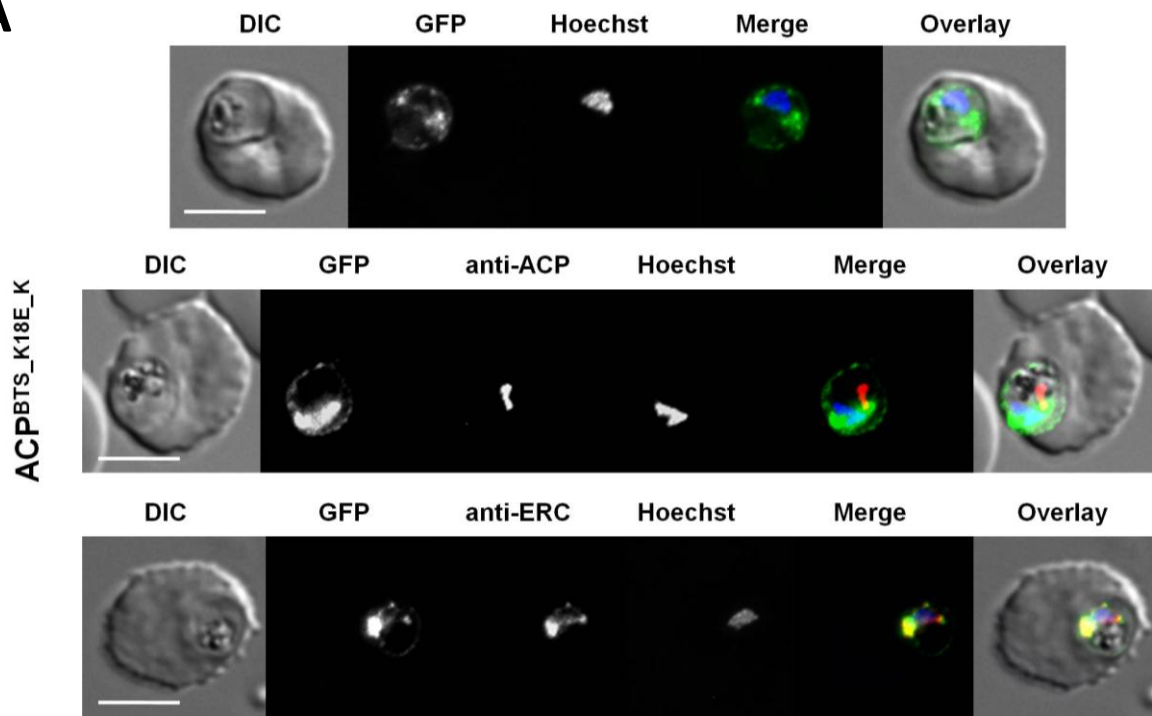
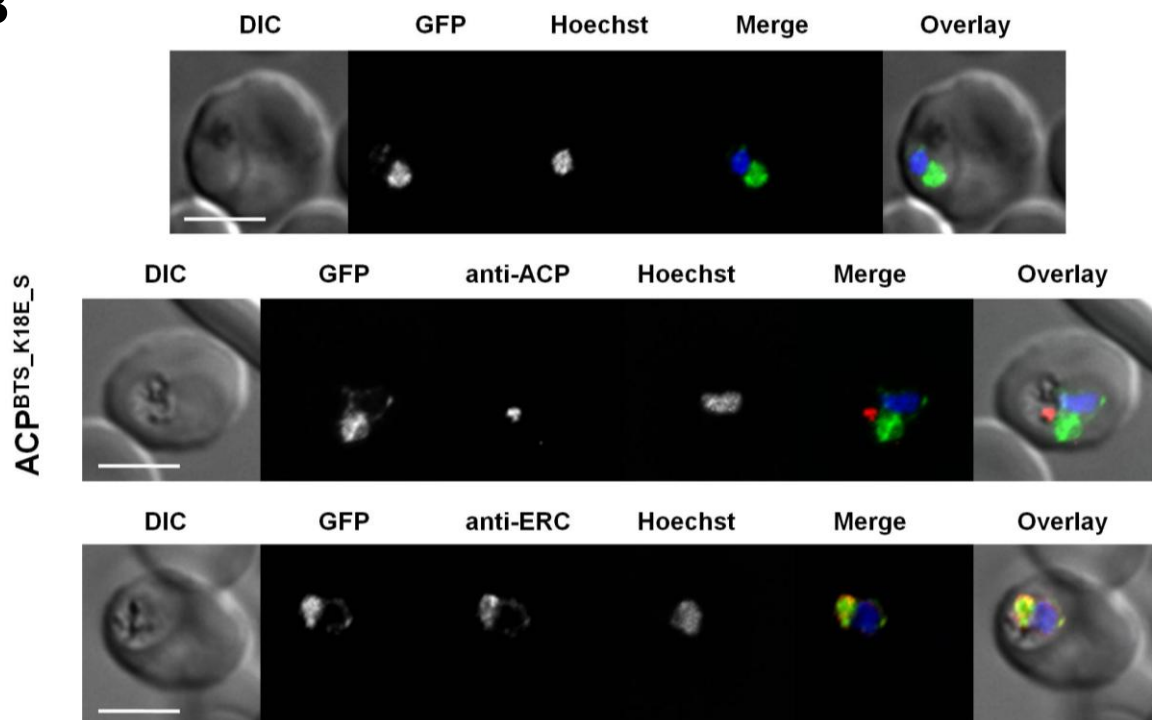
A**B**

Abb. 3.8: Intrazelluläre Lokalisierung der K18E mutierten Reporterproteine in Abhängigkeit der C-terminalen ER *retrieval* Sequenzen -KDEL bzw. -SDEL. (A) *Live cell* Aufnahmen der *ACP^{K18E_K}* Transfektantenlinie (obere Reihe) zeigen ein starkes GFP-Fluoreszenzsignal in der Peripherie des Zellkerns, signalisierend für eine Lokalisierung der Reporterproteine im ER, sowie ein schwaches den Parasiten umgebendes Signal, welches auf eine teilweise Sekretion der Reporterproteine in die PV hindeutet. Immunfluoreszenz Aufnahmen zeigen keine Überlappung der Signale mit dem Apicoplast Marker ACP (mittlere Reihe), sondern ausschließlich mit dem ER Marker ERC (untere Reihe). (B) In lebenden Parasiten der *ACP^{K18E_S}* Zelllinie ist ein Fluoreszenzsignal ausschließlich in der Peripherie des Zellkerns erkennbar (obere Reihe). Keine Co-Lokalisierung mit dem Apicoplast Marker ACP kann detektiert werden (mittlere Reihe). Die GFP-Fluoreszenzsignale stimmen mit dem ER Marker ERC überein (untere Reihe). DIC: Differentialinterferenzkontrast; Merge: GFP Signal (grün) und Hoechst

Signal (blau) in *live cell* Aufnahmen; GFP Signal (grün), Hoechst Signal (blau) und ACP bzw. ERC Signal (rot) in Immunfluoreszenzen; Overlay: DIC und Merge. Größenstandard: 3 µm.

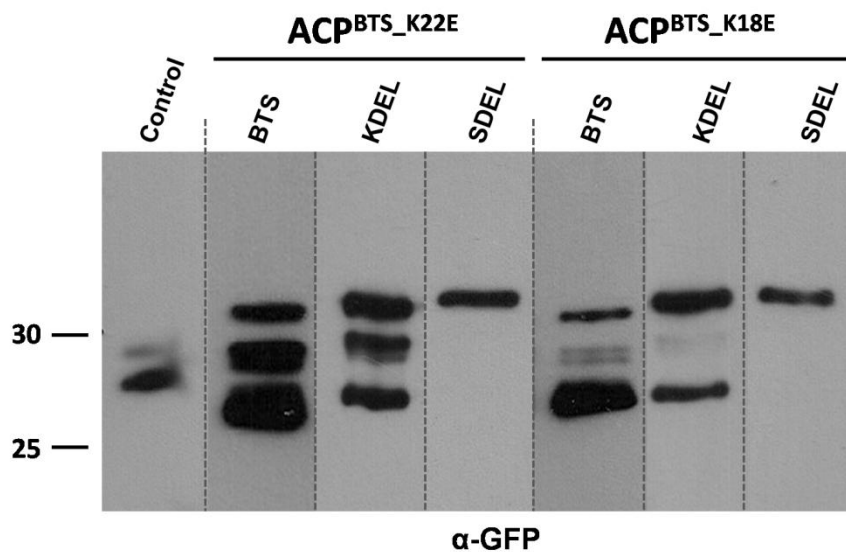


Abb. 3.9: Prozessierung der mutierten Transitpeptide in Abhängigkeit der C-terminalen ER *retrieval* Sequenzen -KDEL bzw. -SDEL.

Transgene Parasiten wurden per Saponin aus den infizierten Erythrozyten isoliert und lysiert. Die Proteine wurden per SDS-Page aufgetrennt und über Western Blot mit anti-GFP Antikörpern immundetektiert. Reporterproteine mit der K22E Mutation werden zu einem großen Teil prozessiert. Im Vergleich dazu wird diese Prozessierung von einer -KDEL Sequenz reduziert, während nach Hinzufügen einer -SDEL Sequenz keine Prozessierung mehr erkennbar ist. Reporterproteine mit der K18E Mutation werden nur zu einem minimalen Teil prozessiert. Das Hinzufügen einer -KDEL oder -SDEL Sequenz führt in beiden Fällen zum Ausbleiben einer detektierbaren Prozessierung. Control.: in *E. coli* exprimiertes prozessiertes ACP Transitpeptid fusioniert an GFP (obere Bande) und GFP alleine (untere Bande). Größenstandard in kDa.

3.1.5 Das Hinzufügen einer C-terminalen -KDEL Sequenz verlangsamt die dynamische Prozessierung eines Apicoplast-gerichteten Reporters im Vergleich zu einem Reporterprotein ohne ER *retrieval* Signal.

Die unterschiedliche Lokalisierung und Prozessierung eines Apicoplast-gerichteten Reporterproteins in Abhängigkeit von "starkem/schwachen" Transitpeptid in Kombination mit "schwachem/starkem" ER *retrieval* Signal, unterstützt unsere Hypothese, dass im künstlich erzeugten Modellsystem zwei gegensätzliche *targeting* Signale im selben Kompartiment miteinander im Konflikt stehen. Nach unseren bisherigen Daten scheint die -SDEL ER *retrieval* Sequenz dominant über das Apicoplast *targeting* Signal des Reporterproteins zu sein (Abb 3.2, 3.3 B). Hingegen kann die -KDEL ER *retrieval* Sequenz den Transport des Reporterproteins zum Apicoplasten nur teilweise verhindern (Abb 3.2, 3.3 B). Entsprechend unserer Hypothese werden diese Reporterproteine im *cis*-Golgi entweder über die BTS vom putativen Transitpeptid Rezeptor gebunden und zum Apicoplasten weitergeleitet, oder aber über die -KDEL Sequenz vom ERD2 Rezeptor zurück zum ER transportiert. Dies bedeutet,

dass ein Teil der -KDEL Reporterproteine über einen oder mehrere Zyklen zwischen Golgi und ER pendelt. In jedem Zyklus können sie dabei erneut mit den zwei unterschiedlichen Rezeptoren interagieren und dementsprechend weitergeleitet werden.

Eine direkte Konsequenz dieser Hypothese wäre, dass einige der -KDEL getaggten Reporterproteine zunächst über einen verlängerten Zeitraum im sekretorischen Weg zirkulieren, bevor sie schlussendlich zum Apicoplasten transportiert werden. Die Prozessierung dieser Reporterproteine im Inneren des Apicoplasten sollte daher im Vergleich zu Reporterproteinen ohne ER *retrieval* Signal langsamer erfolgen.

Um die aufgestellte Hypothese experimentell zu unterstützen, wurden Pulse Chase Experimente mit den beiden Transfektantenlinien ACP^{BTS} und ACP^{BTS_K} durchgeführt. Dafür wurden hochsynchrone Parasitenkulturen im späten Ringstadium für 45 min. radioaktiv markiert und anschließend über einen bestimmten Zeitraum hinweg auf die Prozessierung des Reporterproteins hin analysiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden gleiche Zelläquivalente aus der Kultur entnommen und die Parasiten über Saponin-Lyse aus den Erythrozyten isoliert. Anschließend wurden die Reporterproteine mit anti-GFP magnetischen Beads immunpräzipitiert, über SDS-Page aufgetrennt, und mittel Autoradiographie oder Western Blot detektiert. Da eine radioaktive Markierung ausschließlich von Proteinen erfolgt, die während der 45minütigen Anwesenheit radioaktiv gelabelter Aminosäuren neu synthetisiert werden, kann mittels Autoradiographie ein definierter Satz von neu synthetisiertem Protein analysiert werden; während anti-GFP Western Blot Analysen die absolute Verteilung der immunpräzipitierten Reporterproteine über den angegebenen Zeitraum widerspiegeln.

Die Autoradiographie Aufnahmen (Abb. 3.10 A) zeigen, dass Reporterproteine der ACP^{BTS} Parasitenlinie über den beobachteten Zeitraum von 4 Stunden hinweg, effektiv und vollständig prozessiert werden. Eine Verschiebung des Molekulargewichts der detektierten Reporterproteine von anfänglich ca. 32 kDa entsprechend der unprozessierten Form (0) zu ca. 29 kDa entsprechend dem prozessierten Reporterprotein, ist bereits ab Zeitpunkt 1 zu erkennen. Schon in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Prozessierung eines Apicoplast-lokalisierten Proteins nach ca. 45 Minuten ab Synthese erkennbar ist (van Dooren et al., 2002). Im Gegensatz dazu kann innerhalb von 4 Stunden keine eindeutige Prozessierung -KDEL getaggter Reporterproteine der ACP^{BTS_K} Zelllinie beobachtet werden (Abb. 3.10 A). Die Stärke des detektierten (unprozessierten) Ausgangssignals scheint graduell abzunehmen; eine Visualisierung der prozessierten Form des Reporterproteins ist jedoch innerhalb des hier analysierten Zeitraums nicht möglich. Das Verhältnis von unprozessiertem zu prozessiertem Protein in der Gesamtmenge immunpräzipitierter

Reporterproteine bleibt bei beiden Zelllinien weitestgehend konstant (Abb. 3.10 B) und entspricht der bereits zuvor beobachteten Verteilung (Abb. 3.3 B).

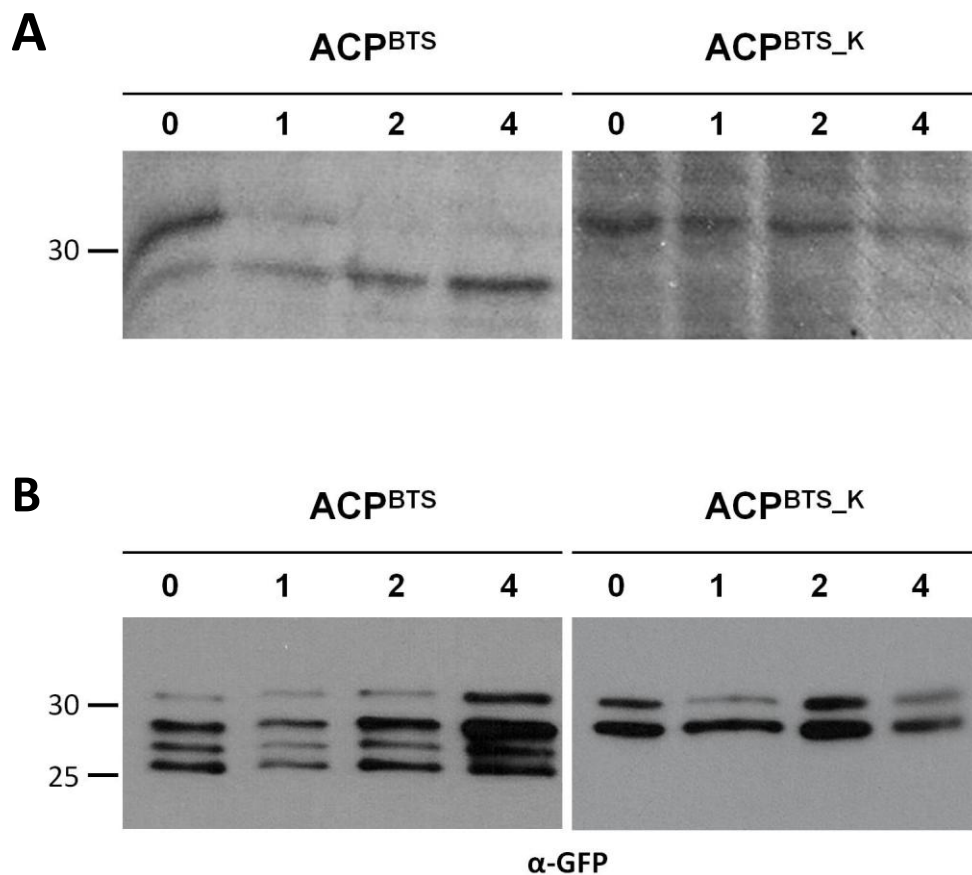


Abb. 3.10: Die C-terminale -KDEL Sequenz verlangsamt die Prozessierung des Reporterproteins der ACP^{BTS_K} Parasiten im Vergleich zur Prozessierung des Reporterproteins der ACP^{BTS} Parasitenlinie.

Hochsynchrone Parasiten im späten Ringstadium wurden für 45 min. mit [³⁵S]-Methionin, -Cystein markiert und anschließend über einen Zeitraum von 4 Stunden analysiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden gleiche Zelläquivalente entnommen und die Parasiten mit Saponin isoliert. Die Reporterproteine wurden mit anti-GFP magnetischen Beads immunpräzipitiert, über SDS-Page aufgetrennt und über Autoradiographie (A) oder anti-GFP Western Blot Analysen (B) detektiert. In Parasiten der ACP^{BTS} Transfektantenlinie erfolgt eine vollständige Prozessierung der Reporterproteine innerhalb von 4 Stunden (A, linke Spalte), während bei ACP^{BTS_K} Parasiten keine Prozessierung innerhalb dieses Zeitraums detektiert werden kann (A, rechte Spalte). Die absolute Verteilung von immunpräzipitiertem, prozessiertem und unprozessiertem Reporterprotein bleibt bei beiden Zelllinien konstant (B). Größenstandard in kDa.

In Parasiten der ACP^{BTS} Transfektantenlinie (Abb. 3.10 A, linke Spalte) erfolgt die Prozessierung eines Apicoplast-lokalisierten Reporterproteins innerhalb des erwarteten Zeitrahmens, der für den Proteintransport zur Plastide benötigt wird (van Dooren et al., 2002). Hingegen kann im selben Zeitraum keine quantifizierbare Menge an -KDEL getaggttem Reporterprotein prozessiert, sprich zum Apicoplasten transportiert werden (Abb. 3.10 A, rechte Spalte). Da eine partielle Prozessierung -KDEL getaggtter Proteine jedoch definitiv stattfindet (Abb. 3.10 B; 3.3 B), bedeutet dies, dass der Transport zum Apicoplasten aufgrund des ER *retrieval* Signals zeitlich verzögert wird. Entsprechende Analysen der ACP^{BTS_K} Parasitenlinie über einen verlängerten Zeitraum hinweg (Abb. 3.11) zeigen, dass

erst nach 8 Stunden eine Prozessierung neu synthetisierter Proteine sattgefunden hat, die quantitativ betrachtet in etwa mit der absoluten Menge an prozessiertem Reporterprotein in dieser Zelllinie vergleichbar ist.

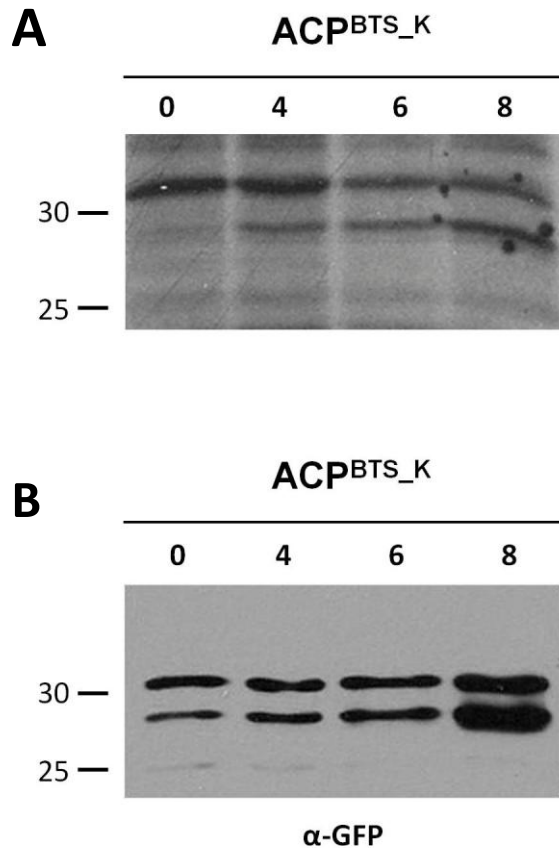


Abb. 3.11: Die Prozessierung des Reporterproteins der ACP^{BTS_K} Parasiten erfolgt innerhalb von 8 Stunden.

Synchronisierte Parasiten im späten Ringstadium wurden für 45 min. mit [35S]-Methionin, -Cystein markiert und anschließend über einen Zeitraum von 8 Stunden hinweg analysiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden gleiche Zelläquivalente entnommen. Die Parasiten wurden mit Saponin isoliert, lysiert und anschließend einer anti-GFP Immunpräzipitation unterzogen. Die immunpräzipitierten Reporterproteine wurden per SDS-Page aufgetrennt und mittels Autoradiographie (A) oder Western Blot mit anti-GFP Antikörpern (B) detektiert. Innerhalb von 8 Stunden erfolgt eine partielle Prozessierung der unprozessierten Ausgangsproteine (A), die dem absoluten Verhältnis von unprozessiertem zu prozessiertem Reporterprotein in dieser Parasitenlinie entspricht (B). Größenstandard in kDa.

Die Prozessierung eines Apicoplast-lokalisierten Reporterproteins mit einer zusätzlichen C-terminalen -KDEL ER *retrieval* Sequenz erfolgt im Vergleich zum Reporterprotein ohne ER *retrieval* Signal nicht nur quantitativ reduziert, sondern auch zeitlich verzögert. Dies deutet darauf hin, dass -KDEL getaggtes Reporterprotein insgesamt über einen verlängerten Zeitraum innerhalb des sekretorischen Weges zurückgehalten wird, vermutlich indem es in sich wiederholenden Zyklen zwischen ER und Golgi pendelt. Im Laufe jedes Zyklus besteht dabei erneut die Möglichkeit vom hypothetischen Transitpeptid-Rezeptor im Golgi gebunden und zum Apicoplasten sortiert zu werden.

3.2 Brefeldin A hat einen negativen Einfluss auf den Proteintransport zum Apicoplasten von *P. falciparum*

Brefeldin A (BFA) ist ein Pilzmetabolit, der mit dem sekretorischen Weg vieler eukaryotischer Organismen interferiert, und deshalb häufig verwendet wird, um sekretorische Prozesse innerhalb einer Zelle, einschließlich Malaria Parasiten, zu untersuchen (Benting et al., 1994; Elmendorf and Haldar, 1993; Lippincott-Schwartz et al., 1989). BFA bindet an Sec7 Domänen von GTP-exchange factors (GEFs), welche die Aktivierung von Arf-GTPasen vermitteln (Arf-GEFs). Arf-GEFs spielen eine wichtige Rolle bei der Formation von COPI Transportvesikeln am Golgi-Apparat (Scales et al., 2000). Die Rekrutierung von COPI Proteinen zur Membran setzt die Aktivierung des ADP-ribosylation factor 1 (Arf1) voraus, was den Austausch von GDP zu GTP am Arf1 Protein mit einschließt. Diese Austauschreaktion wird von Arf-GEF katalysiert; genauer von der konservierten Sec7 Domäne des Proteins (Chardin et al., 1996; Jackson and Casanova, 2000). Brefeldin A stabilisiert die normalerweise transiente Interaktion zwischen Arf1 und Arf-GEF, so dass aktiviertes Arf1 nicht freigesetzt werden kann. Dies führt in Folge zu einem Verlust der Formation neuer COPI Vesikel und dem damit einhergehenden retrograden Vesikeltransport vom Golgi zum ER führt (Kreis and Pepperkok, 1994; Peyroche et al., 1999). Da der anterograde Vesikeltransport vom ER zum Golgi jedoch weiter voranschreitet, führt dies vermutlich zu einer Verschmelzung dieser beiden Organellen (Lippincott-Schwartz et al., 1989; Nebenführ et al., 2002; Sciaky et al., 1997).

Ein Großteil der Hypothese eines Golgi-unabhängigen Proteintransportweges zum Apicoplasten von *P. falciparum*, basiert auf der Beobachtung, dass die Prozessierung Apicoplast-lokalisierter Proteine, und damit der Transport zum, sowie der Import in den Apicoplasten von einer BFA-Behandlung nicht inhibiert wird (Tonkin et al., 2006b). Im Gegensatz zur Dynamik der Prozessierung in unbehandelten Kontrollparasiten, scheint die Prozessierung in Folge einer BFA-Behandlung jedoch stark verzögert, was bislang nicht hinreichend erklärt werden kann (Tonkin et al., 2006b).

Der Effekt von BFA auf den Transport von Apicoplastproteinen soll genauer untersucht werden, indem die intrazelluläre Lokalisierung, sowie die Prozessierung des ACP_BTS Reporterproteins in Abhängigkeit von BFA, vor dem Hintergrund einer BFA-sensitiven und einer BFA-resistenten *P. falciparum* Linie (Baumgartner et al., 2001) verglichen wird.

3.2.1 Generierung einer BFA-resistenten ACP^{BTS_BFAR} Parasitenlinie

Die BFA-resistente *P. falciparum* Linie von Baumgartner und Kollegen (Baumgartner et al., 2001) wurde unter zunehmendem BFA-Selektionsdruck generiert. Die Sequenzierung der genomischen Sequenz einer vorhergesagten Sec7 Domäne des putativen GEFs PF14_0407 (inzwischen PF3D7_1442900; PlasmoDB), dieser Parasitenlinie zeigte eine einzelne G-A Punktmutation, die in einer Methionin zu Isoleucin Substitution resultiert, und für die beobachtete Resistenz verantwortlich ist (Baumgartner et al., 2001; Wiek et al., 2004).

Um eine BFA-resistente ACP^{BTS_BFAR} Parasitenlinie zu generieren, wurde zunächst ein einzelner Klon der BFA-resistenten Zelllinie von Baumgartner und Kollegen über *Limiting Dilution* unter konstantem BFA-Selektionsdruck von 20 µg/ml isoliert und propagiert. Die Sequenzierung der vorhergesagten Sec7 Domäne mit der Resistenz-vermittelnden Methionin zu Isoleucin Substitution dieses Klons ist in Anhang 1 gezeigt. Die so erhaltene Parasitenlinie wurde anschließend mit dem ACP_BTS Reporterkonstrukt transfiziert (ACP^{BTS_BFAR}) und weiter analysiert.

Der Phänotyp der generierten ACP^{BTS_BFAR} Zelllinie wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie und Western Blot Analysen verifiziert (Abb. 3.12). In *live cell* Aufnahmen der ACP^{BTS_BFAR} Zelllinie ist ein deutliches Apicoplast-typisches GFP-Fluoreszenzsignal zu erkennen, das auf eine Lokalisierung des Reporterproteins im Apicoplasten hindeutet (Abb. 3.12 A). Immunfluoreszenz Aufnahmen bestätigen eine Co-Lokalisierung des GFP-Signals mit dem Apicoplast Marker ACP (Abb. 3.12 B). In Western Blot Analysen mit gegen GFP gerichteten Antikörpern sind die erwarteten Banden von ca. 32 kDa entsprechend dem unprozessierten Reporterprotein, bzw. 29 kDa entsprechend dem prozessierten Reporterprotein zu erkennen (Abb. 3.12 C). Dabei kann wie erwartet deutlich mehr Protein der prozessierten Form detektiert werden kann. Ebenfalls erkennbar sind die schon zuvor beobachteten GFP-Degradationsprodukte. Der Phänotyp der hier generierten ACP^{BTS_BFAR} Zelllinie ist vergleichbar mit dem Phänotyp der zuvor generierten ACP^{BTS} Wildtyp Zelllinie (Abb. 3.1 B; 3.2; 3.3 B), und ermöglicht somit einen direkten Vergleich des Effekts von BFA auf die intrazelluläre Lokalisierung und Prozessierung der identischen Reporterproteine vor zwei unterschiedlichen Hintergründen.

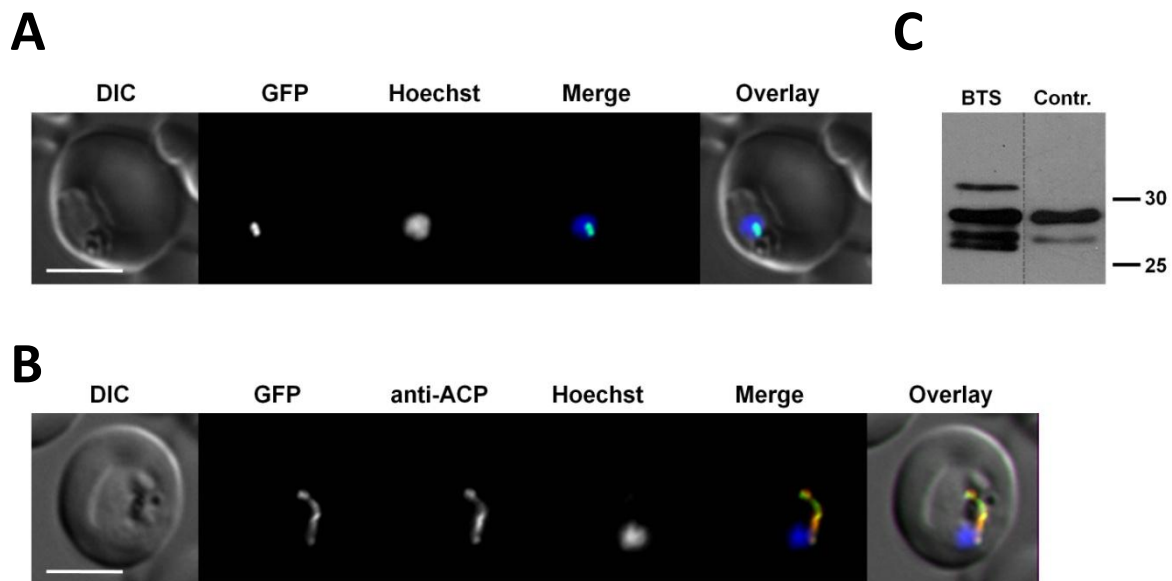


Abb. 3.12: Phänotyp der ACP^{BTS_BFAR} Parasitenlinie.

Live cell Aufnahmen der ACP^{BTS_BFAR} Zelllinie zeigen ein GFP Fluoreszenzsignal, das auf eine Lokalisierung des Reporterproteins im Apicoplasten hindeutet (A). Immunfluoreszenz Aufnahmen mit Antikörpern gegen den Apicoplast Marker ACP zeigen eine Übereinstimmung der beiden fluoreszierenden Signale (B). DIC: Differentialinterferenzkontrast; Merge: GFP Signal (grün) und Hoechst Signal (blau) in (A), GFP Signal (grün), Hoechst Signal (blau) und ACP Signal (rot) in (B); Overlay: DIC und Merge. Größenstandard: 3 μ m. (C) Western Blot Analyse von ACP^{BTS_BFAR} Parasiten mit anti-GFP Antikörpern. Erkennbar ist eine ca. 32 kDa Bande entsprechend dem unprozessierten Reporterprotein, sowie eine dominanter Banden von ca. 29 kDa entsprechend dem prozessierten Reporterprotein. Ebenfalls detektierbar sind GFP Degradationsprodukte. Control: prozessiertes ACP Transitpeptid fusioniert an GFP (obere Bande) und GFP alleine (untere Bande); exprimiert in *E. coli*. Größenstandard in kDa.

3.2.2 Eine Behandlung mit BFA beeinflusst die intra-erythrozytäre Entwicklung und die intrazelluläre Lokalisierung des Reporterproteins der ACP^{BTS} Wildtyp Zelllinie, nicht aber der ACP^{BTS_BFAR} Zelllinie

Um den Effekt von BFA auf die intra-erythrozytäre Entwicklung der Parasiten selbst, sowie auf die intrazelluläre Lokalisierung des Reporterproteins zu untersuchen, wurden die beiden Parasitenlinien ACP^{BTS} und ACP^{BTS_BFAR} in der Gegenwart von 4 μ g/ml BFA kultiviert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. *Live cell* Aufnahmen der ACP^{BTS_BFAR} Zelllinie zeigen, dass in der Gegenwart von BFA eine normale Progression durch den intra-erythrozytären Lebenszyklus stattfindet (Abb. 3.13). Ausgehend vom frühen Ringstadium (i), mit der typischen sichelförmigen Zellkernfärbung und einem für den frühen Apicoplasten typischen Fluoreszenzsignal, reifen die Parasiten zunächst über junge Trophozoiten (ii) zu späten Trophozoiten/frühen Schizonten (iii), und entwickeln sich schließlich zu reifen Schizonten mit mehreren neu gebildeten Merozoiten (iv). Die beobachteten GFP-Fluoreszenzsignale stimmen dabei mit der bekannten Morphologie eines sich entwickelnden Apicoplasten überein (Waller and McFadden, 2005); von anfänglich punktförmig (i), dehnt sich der Apicoplast aus (ii) und bildet ein weitverzweigtes Netzwerk (iii), über das im reifen Schizonten jeder Merozoit seinen eigenen Apicoplasten erhält (iv).

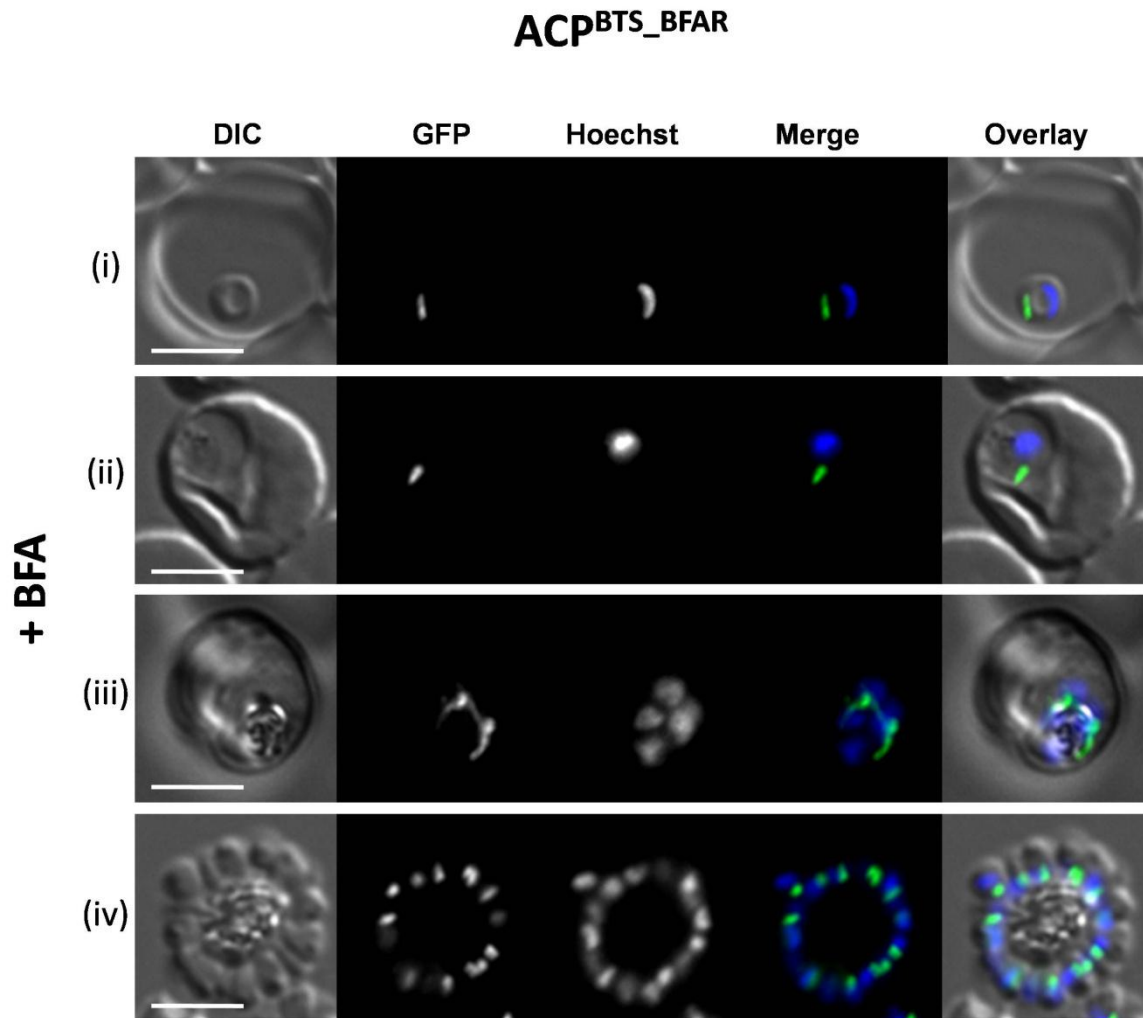


Abb. 3.13: Intra-erythrozytäre Entwicklung der ACP^{BTS_BFAR} Zelllinie in Anwesenheit von Brefeldin A.

Live cell Aufnahmen der ACP^{BTS_BFAR} Parasitenlinie, die in Gegenwart von 4 µg/ml BFA kultiviert wurde, zeigen eine normale Progression durch den intra-erythrozytären Entwicklungszyklus. Die GFP-Fluoreszenzsignale des Reporterproteins stimmen mit der bekannten Morphologie eines sich entwickelnden Apicoplasten überein. DIC: Differentialinterferenzkontrast; Merge: GFP Signal (grün) und Hoechst Signal (blau); Overlay: DIC und Merge; Größenstandard: 3 µm.

Im Gegensatz zur ACP^{BTS_BFAR} Parasitenlinie, wird die intra-erythrozytäre Entwicklung von ACP^{BTS} Wildtyp Parasiten unter Einfluss von BFA signifikant beeinträchtigt (Abb. 3.14). In *live cell* Aufnahmen der ACP^{BTS} Zelllinie ist zu erkennen, dass frühe Ringstadien (i) nach der Zugabe von 4 µg/ml BFA in ihrer Entwicklung stagnieren (ii), während unbehandelte Parasiten zu Trophozoiten heranreifen (iv); ein Phänomen, von dem schon früher berichtet wurde (Wickham et al., 2001). Gelegentlich konnten jedoch auch einzelne Parasiten beobachtet werden, die in ihrer Entwicklung trotz BFA voranschreiten (iii), wobei in diesen Parasiten das charakteristische Signal für eine Apicoplast-Lokalisierung des Reporterproteins verloren geht, und sich eher diffus in der Peripherie des Zellkerns ausbreitet (iii). Dies deutet auf einen direkten Effekt von BFA und eine einhergehende Störung des Proteintransports zum Apicoplasten hin. Desweiteren sind in behandelten

Kulturen vermehrt abgestorbene Zell-Debris vorzufinden, die hier aufgrund der starken Autofluoreszenz nicht gezeigt sind.

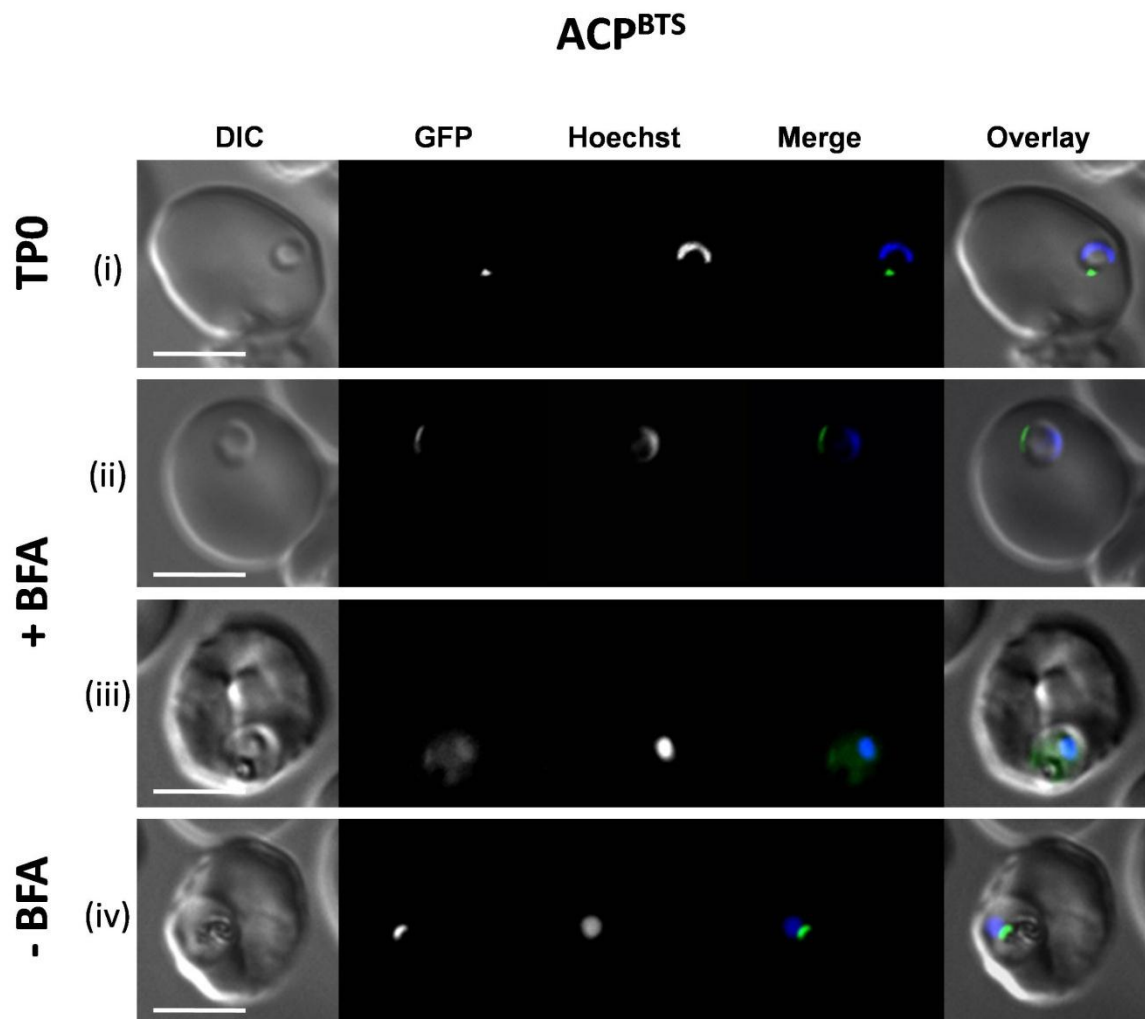


Abb. 3.14: Effekt von Brefeldin A auf die intra-erythrozytäre Entwicklung und intrazelluläre Lokalisierung des Reporterproteins der ACP^{BTS} Wildtyp Parasiten.

Live cell Aufnahmen der ACP^{BTS} Wildtyp Zelllinie zeigen, dass eine Behandlung früher Ringstadien (i) mit 4 µg/ml BFA für 15 Stunden zu einer Stagnation im Entwicklungszyklus (ii) oder, bei sich weiter entwickelnden Parasiten, zu einem Verlust des Apicoplast-typischen Fluoreszenzsignals des Reporterproteins führt (iii). Unbehandelte Kontrollparasiten zeigen keine Beeinträchtigung der Entwicklung. Das Apicoplast-typische Fluoreszenzsignal bleibt erhalten (iv). DIC: Differentialinterferenzkontrast; Merge: GFP Signal (grün) und Hoechst Signal (blau); Overlay: DIC und Merge; Größenstandard: 3 µm.

3.2.3 Eine Behandlung mit BFA führt zur Anhäufung von unprozessiertem Reporterprotein in der ACP^{BTS} Wildtyp Zelllinie, nicht aber in der BFA-resistenten ACP^{BTS_BFAR} Zelllinie

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass eine Behandlung mit BFA zum Verlust des Apicoplast-typischen Fluoreszenzsignals des Reporterproteins der ACP^{BTS} Wildtyp Parasiten führen kann (Abb. 3.14 iii), was auf einen gestörten Proteintransport zum Apicoplasten hindeutet. Wie bereits erwähnt, werden Transitpeptide von Apicoplastproteinen im Lumen der Plastide von einer spezifischen Peptidase gespalten. Diese Prozessierung kann als Maß für einen erfolgreichen Transport zum und Import in den Apicoplasten herangezogen werden. Um den Effekt von BFA auf die Prozessierung des ACP^{BTS} Reporterproteins zu untersuchen, wurden synchronisierte ACP^{BTS} Wildtyp Parasiten und BFA-resistente ACP^{BTS_BFAR} Parasiten im späten Ringstadium für bis zu 8 Stunden in der Anwesenheit von 4 µg/ml BFA kultiviert, und anschließend per SDS-Page und Western Blot im Vergleich zu unbehandelten Kontrollparasiten analysiert. Dabei wurden zu Beginn des Experiments (0) und zu allen weiteren Zeitpunkten jeweils gleiche Zelläquivalente aus der Kultur entnommen, und die Parasiten mittels Saponin aus den Erythrozyten isoliert.

In ACP^{BTS} Wildtyp Parasiten führt eine 8stündige Behandlung mit 4 µg/ml Brefeldin A zu einer Anhäufung von unprozessiertem Reporterprotein im Vergleich zu unbehandelten Kontrollparasiten (Abb. 3.15 A). Dies deutet darauf hin, dass der Proteintransport zum Apicoplasten in dieser Zelllinie durch BFA beeinträchtigt wird, und somit keine Prozessierung des Reporterproteins im Lumen des Apicoplasten erfolgen kann. Das hoch abundante *P. falciparum* heat shock protein 70 (PfHsp70) dient als vergleichende Ladekontrolle. Deutlich zu erkennen ist, dass in behandelten Kulturen, trotz berechneter identischer Zelläquivalente, weniger Gesamtprotein detektiert werden kann. Dies lässt darauf schließen, dass die Parasiten im Laufe des Experiments abgestorben sind. Die signifikante Bande bei ca. 32 kDa, entsprechend dem unprozessierten Reporterprotein, könnte in dieser Kultur diejenigen Parasiten repräsentieren, welche in ihrer Entwicklung voranschreiten, jedoch einen Verlust des Apicoplast-typischen Fluoreszenzsignals in mikroskopischen Untersuchungen aufweisen (Abb. 3.14 iii). Im Gegensatz dazu kann bei den ACP^{BTS_BFAR} Parasiten kein signifikanter Unterschied in der Verteilung von unprozessiertem und prozessiertem Reporterprotein in Abhängigkeit von BFA beobachtet werden (Abb. 3.15 A, rechte Spalte). Dies lässt vermuten, dass BFA in dieser Zelllinie nicht mit dem Proteintransport zum Apicoplasten interferiert, und somit die Prozessierung des Reporterproteins im Inneren des Apicoplasten stattfinden kann. Eine 6stündige BFA Behandlung von ACP^{BTS} Wildtyp und ACP^{BTS_BFAR} Parasiten führt zu ähnlichen Ergebnissen (Abb. 3.15 B). In behandelten Kulturen der ACP^{BTS} Wildtyp Parasitenlinie kann eine Anhäufung von unprozessiertem Reporterprotein im Vergleich zu unbehandelten Kontrollparasiten detektiert werden. Hierbei ist ebenfalls eine reduzierte

Gesamtproteinmenge vorhanden, was auf ein Absterben der Parasiten als Folge der Behandlung hindeutet. Das Verhältnis von unprozessiertem zu prozessiertem Reporterprotein in der ACP^{BTS_BFAR} Parasitelinie hingegen, bleibt von BFA unbeeinträchtigt (Abb. 3.15 B, rechte Spalte).

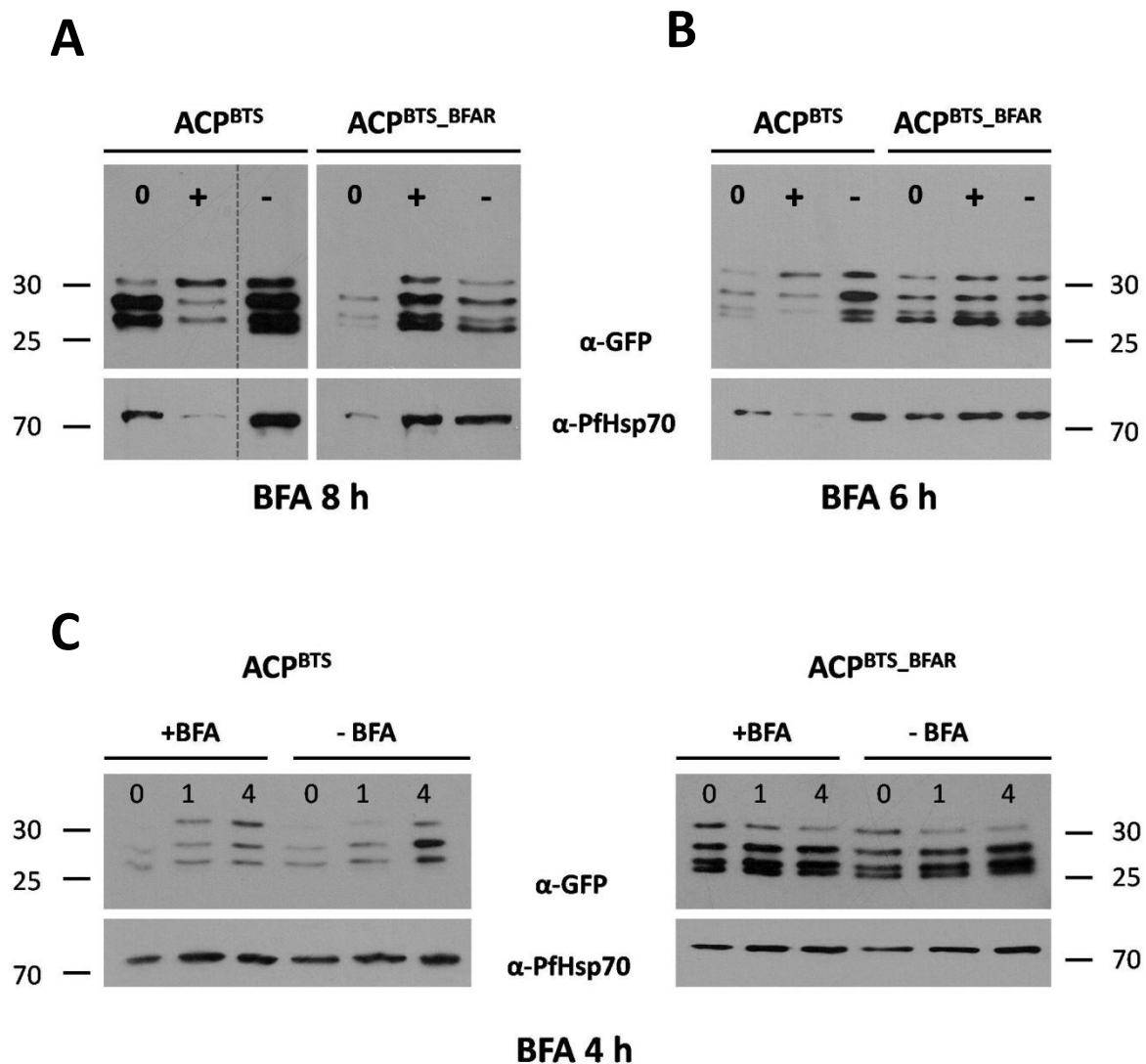


Abb. 3.15: Brefeldin A führt zu einer Akkumulation von unprozessiertem Reporterprotein in der ACP^{BTS} Wildtyp Zelllinie, nicht aber in BFA-resistenten ACP^{BTS_BFAR} Parasiten.

Synchrone ACP^{BTS} und ACP^{BTS_BFAR} Parasiten im späten Ringstadium wurden für 8 Stunden (A), 6 Stunden (B) und 4 Stunden (C) in der An- bzw. Abwesenheit von 4 µg/ml BFA kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden gleiche Zelläquivalente entnommen. Die Parasiten wurden mit Saponin aus den Erythrozyten isoliert und in reduzierendem Probenpuffer aufgekocht. Die Zelllysate wurden über SDS-Page aufgetrennt und per Western Blot mit anti-GFP Antikörpern bzw. anti-PfHsp70 Antikörpern immunodetektiert. Größenstandard in kDa.

Nach einer 4stündigen Inkubation mit BFA (Abb. 3.15 C), kann in ACP^{BTS} Wildtyp Parasiten ebenfalls eine Akkumulation von unprozessiertem Reporterprotein detektiert werden, welche bereits nach einer Stunde erkennbar ist. Frühere Studien haben gezeigt, dass der

Proteinimport in den Apicoplasten ab Synthese ca. 45 Minuten benötigt (van Dooren et al., 2002). Eine Anhäufung von unprozessiertem Reporterprotein nach einer Stunde signalisiert, dass neu synthetisiertes Protein während dieser Zeit nicht erfolgreich zum Apicoplasten transportiert werden kann. Nach 4 Stunden ist im Vergleich zu unbehandelten Kontrollparasiten eine starke Ansammlung von unprozessiertem, und signifikant weniger prozessiertes Reporterprotein detektierbar, wobei ein gewisses Maß an Prozessierung dennoch erkennbar ist. Eine Behandlung mit BFA für 4 Stunden führte nur in einzelnen Ausnahmefällen zum Absterben der Parasiten. Wie bei den vorherigen Untersuchungen ist in der ACP^{BTS_BFAR} Parasitelinie kein Effekt von BFA auf die Prozessierung des Reporterproteins erkennbar (Abb. 3.15 C).

3.2.4 Eine Behandlung mit BFA verzögert die Prozessierung des Reporterproteins der ACP^{BTS} Wildtyp Zelllinie, nicht aber der BFA-resistenten ACP^{BTS_BFAR} Zelllinie.

In früheren Studien wurde postuliert, dass der Proteintransport zum Apicoplasten von *P. falciparum* von Brefeldin A nicht inhibiert wird, und somit vermutlich über einen Golgi-unabhängigen Transportweg erfolgt (Tonkin et al., 2006b). Es konnte gezeigt werden, dass die Prozessierung eines Apicoplast-lokalisierten Reporterproteins auch in Anwesenheit von BFA stattfindet. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollparasiten, erfolgte diese Prozessierung jedoch unvollständig und zeitlich stark verzögert, was nur unzureichend erklärt werden konnte. Eine Erklärung für die beobachtete Verzögerung der Prozessierung als Folge einer BFA-Behandlung könnte die Inhibition weiterer Arf-GEFs sein, die möglicherweise am Proteintransport zum / in den Apicoplasten beteiligt sind; oder aber eine bislang unbekannter Effekt von BFA auf andere Moleküle, die eine Rolle beim Proteintransport spielen (Tonkin et al., 2006b). Da im Genom von *P. falciparum*, nach unserem Wissen, nur eine einzige Sec7-Domäne kodiert ist (Baumgartner et al., 2001; Wiek et al., 2004), erscheint die erste Hypothese eher unwahrscheinlich. Im Falle, dass die beobachtete Verzögerung der Prozessierung in Anwesenheit von BFA auf einen unbekannten Nebeneffekt von BFA, über die Inhibition von Arf-GEF hinaus, zurückzuführen ist, wäre eine entsprechende Verzögerung auch in der BFA-resistenten Zelllinie zu erwarten, deren Resistenz auf einer einzigen Methionin zu Isoleucin Substitution in der Sec7 Domäne des Arf-GEF beruht (Anhang 1).

In Western Blot Analysen (Abb. 3.15) ist keine Verzögerung der Prozessierung des ACP_{BTS} Reporterproteins in der BFA-resistenten ACP^{BTS_BFAR} Parasitelinie erkennbar. Um die Dynamik der Prozessierung genauer zu untersuchen, wurde ein Pulse Chase mit beiden Zelllinien ACP^{BTS} und ACP^{BTS_BFAR} in der An- bzw. Abwesenheit von BFA durchgeführt. Dafür

wurden hochsynchrone Parasiten im Ringstadium für 45 Minuten radioaktiv markiert, und anschließend über einen Zeitraum von 4 Stunden hinweg in An- bzw. Abwesenheit von Brefeldin A inkubiert. Zu jedem Zeitpunkt wurden gleiche Zelläquivalente entnommen und die Parasiten mittels Saponin-Lyse aus den infizierten Erythrozyten freigesetzt. Die Reporterproteine wurden mit anti-GFP magnetischen Beads immunpräzipitiert, über SDS-Page aufgetrennt und anschließend mittels Western Blot oder Autoradiographie detektiert (Abb. 3.16; 3.17). Eine radioaktive Markierung erfolgt hierbei nur von Proteinen, die während des 45minütigen Pulse neu synthetisiert wurden und die gelabelten Aminosäuren inkorporiert haben. Die autoradiographische Detektion ermöglicht es somit, einen definierten Satz von neu synthetisiertem Protein über einen bestimmten Zeitraum hinweg zu verfolgen, während mittels Western Blot Analysen die absolute Reporterproteinmenge und -verteilung im Laufe des Experiments dargestellt werden kann.

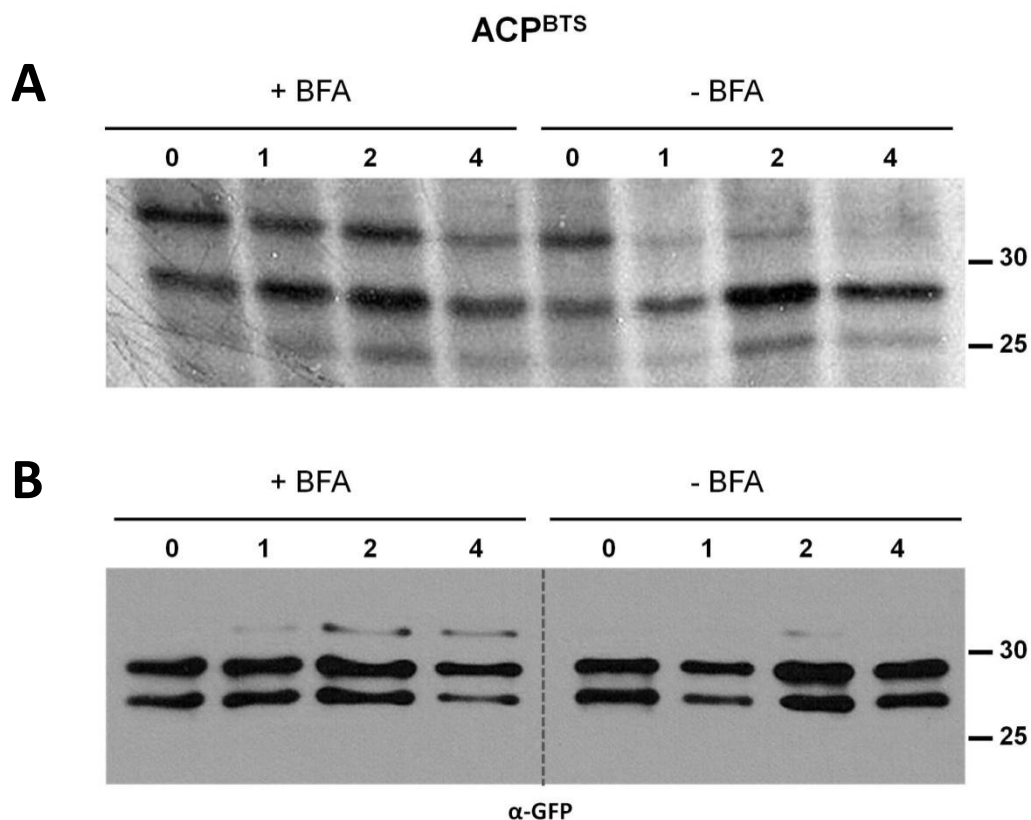


Abb. 3.16: Brefeldin A verzögert die Prozessierung des Reporterproteins der ACP^{BTS} Wildtyp Parasiten.

Hochsynchrone Parasiten im späten Ringstadium wurden für 45 min. mit [³⁵S]-Methionin, -Cystein markiert und anschließend über einen Zeitraum von 4 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von 4 µg/ml BFA inkubiert. Zu jedem angegebenen Zeitpunkt wurden gleiche Zelläquivalente entnommen, und die Zelllysate der Saponin-isolierten Parasiten mit anti-GFP immunpräzipitiert. Die so gewonnenen Proteinfractionen wurden per SDS-Page aufgetrennt und mittels Autoradiographie (A) und anti-GFP Western Blot (B) detektiert. Über den beobachteten Zeitraum von 4 Stunden hinweg, werden in unbehandelten Kontrollparasiten unprozessierte Ausgangsproteine (0) erfolgreich prozessiert, während in BFA-behandelten Parasiten auch nach 4 Stunden noch eine signifikante Menge von unprozessiertem Protein detektierbar ist (A). In den entsprechenden Western Blot Analysen ist in der Gesamtproteinverteilung im Laufe des Experimentes eine Anhäufung von unprozessiertem Protein in Abhängigkeit von BFA erkennbar (B). Größenstandard in kDa.

Die Autoradiographie Aufnahmen (Abb. 3.16 A) zeigen, dass bei unbehandelten ACP^{BTS} Wildtyp Parasiten eine vollständige Prozessierung der radioaktiv markierten Proteine über den beobachteten Zeitraum von 4 Stunden hinweg erfolgt. Eine Verschiebung des Molekulargewichts der detektierten Proteine von ca. 32 kDa zu Beginn des Experimentes (0) nach ca. 29 kDa, entsprechend der prozessierten Form des Reporterproteins, im weiteren Verlauf ist deutlich erkennbar. In Anwesenheit von BFA hingegen, kann eine deutliche Verzögerung in der Dynamik der Prozessierung beobachtet werden. Nach 4 Stunden ist zwar prozessiertes Reporterprotein detektierbar, eine signifikante Menge liegt jedoch nach wie vor in unprozessierter Form vor, was auf einen direkten Effekt von BFA auf den Proteintransport zum Apicoplasten hindeutet. In den entsprechenden Western Blot Analysen (Abb. 3.16 B), ist in Abhängigkeit von BFA in der absoluten Reporterproteinmenge eine Anhäufung der unprozessierten Form zu erkennen.

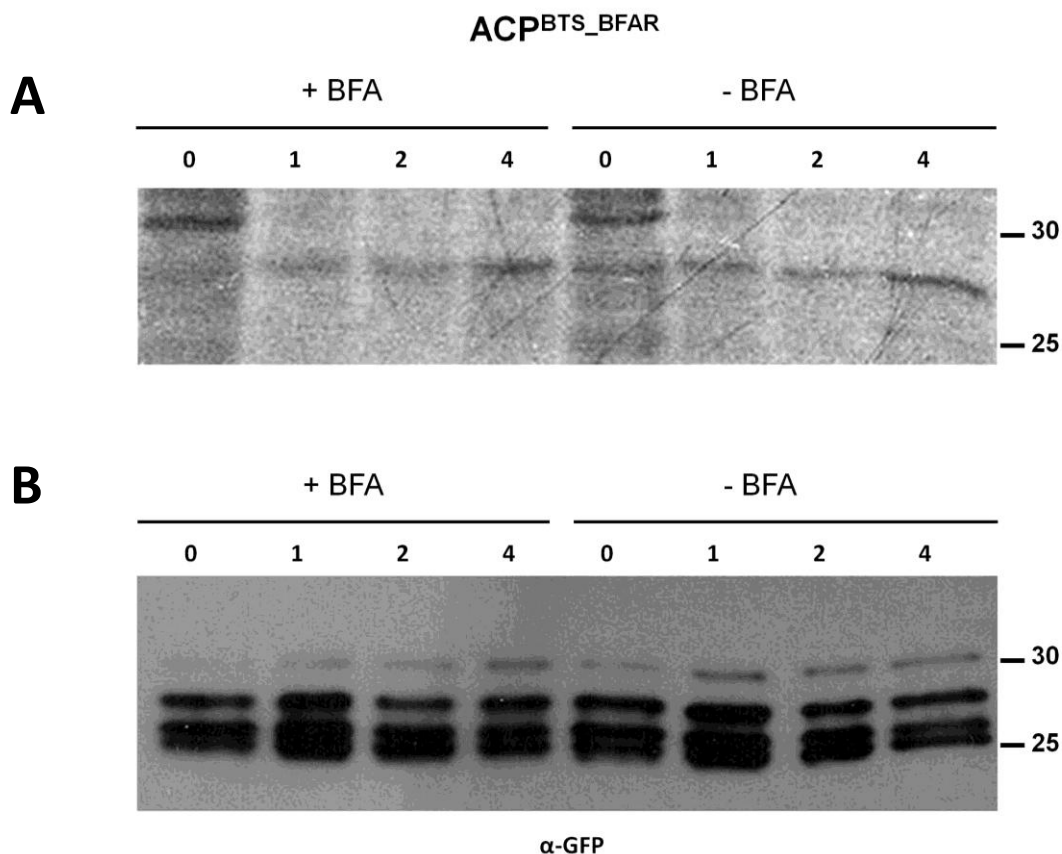


Abb. 3.17: BFA hat keinen Einfluss auf die Prozessierung des Reporterproteins der ACP^{BTS}_BFAR Parasiten.

Hochsynchrone Parasiten im späten Ringstadium wurden für 45 min. mit [³⁵S]-Methionin, -Cystein markiert und anschließend über einen Zeitraum von 4 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von 4 µg/ml BFA inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden gleiche Zelläquivalente entnommen. Die Parasiten wurden Saponin-isoliert, lysiert und anschließend einer anti-GFP Immunpräzipitation unterzogen. Die erhaltenen Proteinfractionen wurden per SDS-Page aufgetrennt und mittels Autoradiographie (A) und anti-GFP Western Blot (B) detektiert. Sowohl in BFA-behandelten, als auch in unbehandelten Kontrollparasiten, ist nach 4 Stunden eine vollständige Prozessierung der unprozessierten Ausgangsproteine zu erkennen (A). Das Verhältnis von prozessiertem zu unprozessiertem Protein zu individuellen Zeitpunkten des Experimentes ist dabei unabhängig von BFA, sowohl in der radioaktiv gelabelten Proteinfraction (A), als auch in der Gesamtproteinmenge (B). Größenstandard in kDa.

Im Gegensatz zur ACP^{BTS} Wildtyp Zelllinie, kann bei BFA-resistenten ACP^{BTS_BFAR} Parasiten kein signifikanter Unterschied in der Dynamik der Prozessierung des Apicoplast-lokalisierten Reporterproteins in Abhängigkeit von BFA beobachtet werden (Abb. 3.17). Nach 4 Stunden ist sowohl in behandelten als auch in unbehandelten Kontrollparasiten eine vollständige Prozessierung der radioaktiv markierten Proteine erkennbar (Abb. 3.17 A). Entsprechende Western Blot Analysen zeigen, dass die absolute Verteilung von unprozessiertem und prozessiertem Reporterprotein, unabhängig von BFA, im Laufe des Experiments unverändert bleibt (Abb. 3.17 B).

Brefeldin A ist ein potenter Inhibitor des sekretorischen Weges in vielen eukaryotischen Organismen, einschließlich *P. falciparum* (Benting et al., 1994; Lippincott-Schwartz et al., 1989; Wickham et al., 2001), der mit dem Vesikeltransport zwischen Golgi und ER interferiert. Der Transport von Proteinen zum Apicoplasten von *P. falciparum* erfolgt nach gegenwärtigen Modellen bevorzugt über ein spezielles vesikuläres Transportsystem, das bereits im ER vom *default* sekretorischen Weg abgegrenzt wird. Die hier angestellte vergleichende Untersuchung eines Apicoplast-lokalisierten Reporterproteins vor dem Hintergrund einer BFA-sensitiven und einer BFA-resistenten Parasitenlinie zeigt einen Effekt von Brefeldin A auf i) die intrazelluläre Lokalisierung des Reporterproteins (Abb. 3.14), ii) die quantitative Rate der Prozessierung des Reporterproteins (Abb. 3.15) und iii) die zeitgebundene Dynamik der Prozessierung des Reporterproteins (Abb. 3.16), welcher nur in sensitiven Parasiten beobachtet werden kann. Zusammenfassend kann dies als negativer Effekt von Brefeldin A auf den Transport von Apicoplast Proteinen gedeutet werden.

4 Diskussion

Der Transport Zellkern-kodierter Proteine zum Apicoplasten von *P. falciparum* ist ein komplexer Prozess, bei dem lösliche luminale Apicoplast Proteine über 4 Membranen hinweg transloziert werden müssen. Molekulare Komponenten, die für die Translokation über die drei inneren Membranen der Plastide verantwortlich sind, konnten im Laufe der letzten Jahre identifiziert und teilweise näher charakterisiert werden (Glaser et al., 2012; Kalanon et al., 2009; Spork et al., 2009; van Dooren et al., 2008). Auch die Signale, die einen zielgerichteten Transport löslicher Proteine zum und in den Apicoplasten vermitteln, sind weitestgehend bekannt. Über eine zweiteilige N-terminale BTS werden Apicoplast Proteine zunächst co-translational ins ER inseriert und von dort über ein bislang unbekanntes Transportsystem zum Apicoplasten transportiert (Waller et al., 1998; Waller et al., 2000). Für dieses Transportsystem stehen verschiedene Modelle zur Diskussion, wobei ein direkter vesikulärer ER zu Apicoplast Transport bevorzugt wird. Demgegenüber stehen direkte Kontaktstellen zwischen ER Membran und äußerer Apicoplasten Membran, oder ein vesikulärer Transport, der entlang des sekretorischen Weges über einen Sortierungsschritt im Golgi-Apparat erfolgt. Ziel dieser Arbeit war es eine mögliche Beteiligung des Golgi-Apparates am Proteintransport zum Apicoplasten von *P. falciparum* zu untersuchen. Dafür wurde ein lösliches Apicoplast-gerichtetes Reporterprotein anhand zweier verschiedener Ansätze in Hinblick auf die (Golgi-abhängige) intrazelluläre Lokalisierung und Prozessierung im Apicoplasten analysiert. Als Modellprotein wurde ein GFP Fusionsprotein mit der N-terminalen gut beschriebenen BTS des löslichen Apicoplasten Proteins ACP konstruiert. In einem ersten Ansatz wurde dieses Reporterprotein C-terminal mit unterschiedlichen ER *retrieval* Sequenzen markiert und anhand verschiedener Methoden im Vergleich zum Reporterprotein ohne ER *retrieval* Signal analysiert. ER *retrieval* Sequenzen sind C-terminale Extensionen vieler löslicher ER-residenter Proteine, anhand derer (fehlgeleitete) Proteine im *cis*-Golgi von einem membranständigen Rezeptor (ERD2) abgefangen und zum ER zurück transportiert werden (Nilsson and Warren, 1994; Semenza et al., 1990). ER *retrieval* Sequenzen können daher als Golgi-spezifische Erkennungssequenzen angesehen werden. In einem zweiten Ansatz wurde der Transport des Reporterproteins unter Einfluss von Brefeldin A untersucht, auch vor dem Hintergrund einer BFA-resistenten *P. falciparum* Zelllinie. BFA interferiert mit dem Vesikeltransport zwischen Golgi und ER, was in Folge dessen zum Erliegen des sekretorischen Weges führt (Lippincott-Schwartz et al., 1989; Peyroche et al., 1999). BFA kann daher als Inhibitor des Golgi-abhängigen Proteintransports angesehen werden. Anhand beider Ansätze konnten im Laufe dieser Arbeit Ergebnisse erzielt werden, die für eine Beteiligung des Golgi-Apparates am Transport des löslichen Reporterproteins zum Apicoplasten von *P. falciparum* sprechen.

4.1 C-terminale ER *retrieval* Sequenzen haben einen negativen Einfluss auf den Transport eines Reporterproteins zum Apicoplasten von *P. falciparum*

Um die Position des Apicoplasten im sekretorischen Weg besser zu verstehen, wurde ein Apicoplast-gerichtetes Reporterprotein C-terminal mit zwei unterschiedlichen ER *retrieval* Sequenzen (-KDEL bzw. -SDEL) markiert und in Hinblick auf die intrazelluläre Lokalisierung und Prozessierung analysiert. Ähnlich wie in früheren Studien (Tonkin et al., 2006b) wurde dem die Überlegung zugrunde gelegt, dass Proteine, die auf direktem Weg vom ER zur Plastide transportiert werden, von einer ER *retrieval* Sequenz nicht beeinflusst werden sollten. Hingegen sollten Proteine, deren Transport zum Apicoplasten den Golgi-Apparat miteinschließt, anhand des ER *retrieval* Signals vom Golgi-residenten ERD2 Rezeptor abgefangen und zum ER zurückgeleitet werden. Ein Golgi-abhängiger Proteintransport zum Apicoplasten sollte folglich durch ER *retrieval* Sequenzen gestört werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten unterschiedlichen Analysen zeigen, dass durch das Hinzufügen einer C-terminalen ER *retrieval* Sequenz i) die intrazelluläre Lokalisierung der Reporterproteine beeinflusst wird (Abb. 3.2), ii) eine quantitativ verminderte Prozessierung (Apicoplast Import) der Reporterproteine stattfindet (Abb. 3.3) und iii) die Rest-Prozessierung im Vergleich zu Reporterproteinen ohne ER *retrieval* Signal zeitlich stark verzögert erfolgt (Abb. 3.10; 3.11). Dies lässt die Vermutung zu, dass Apicoplast-gerichtete Proteine über einen Zwischenschritt im Golgi-Kompartiment zur Plastide transportiert werden. Interessanterweise wird sowohl die intrazelluläre Lokalisierung als auch die Prozessierung der Reporterproteine von einer -SDEL ER *retrieval* Sequenz deutlich signifikanter beeinflusst als von einem -KDEL Motiv (Abb. 3.2; 3.3). Während das -KDEL Signal nur eine partielle Rücksendung der Reporterproteine zum ER des Parasiten vermitteln kann, was sich an einer teilweisen Co-Lokalisierung der Reporterproteine mit dem Apicoplast Marker ACP in Immunfluoreszenz Aufnahmen (Abb. 3.2) und einer dementsprechend detektierbaren Prozessierung in Western Blot Analysen (Abb. 3.3 B) verdeutlicht, ist die -SDEL Sequenz dominant über die Apicoplast *targeting* Information des Reporterproteins. Weder in Immunfluoreszenz Aufnahmen, noch anhand von Western Blot Analysen kann eine signifikante Apicoplast Lokalisierung / Prozessierung der Reporterproteine beobachtet werden (Abb. 3.2; 3.3). Es ist bekannt, dass unterschiedliche Organismen verschiedene Variationen des xDEL ER *retrieval* Signals bevorzugen um ER-residente Proteine im Golgi-Apparat über den ERD2 Rezeptor abzufangen und zum ER zurückzuleiten (Lewis et al., 1990). Dies könnte bedeuten, dass die -KDEL Sequenz im Plasmodien System generell ein weniger potentes ER *retrieval* Signal darstellt. Da andere sekretorische Proteine von *P. falciparum* von einer -KDEL Sequenz jedoch effizient und vollständig zum ER zurückgeleitet

werden (Külzer et al., 2009; Przyborski et al., 2005) und es darüberhinaus eine Reihe vorhergesagter -KDEL Proteinen gibt (Külzer et al., 2009), erscheint diese Erklärung weniger plausibel. Der Golgi-Apparat bildet in anderen Organismen eine Plattform für die finale Sortierung unterschiedlicher sekretorischer Proteine (Wilson et al., 2011). Auch in *P. falciparum* werden sekretorische Proteine zunächst über den Golgi-Apparat passagiert und anschließend in die PV sekretiert, in welcher gegebenenfalls weitere Sortierungsschritte und Transportsysteme für einen Transport ins Zytosol der Wirtszelle zum Einsatz kommen (Deponte et al., 2012). Auch der Proteintransport zu den einzigartigen Kompartimenten von *P. falciparum*, wie der Nahrungsvakuole oder den Organellen des Apikalkomplex, schließt eine Passage durch den Golgi-Apparat mit ein (Deponte et al., 2012). Unter der Annahme eines hypothetischen Transitpeptid-Rezeptors, der Transitpeptide Apicoplast-gerichteter Proteine ebenfalls im Golgi erkennt und sortiert, würde dies bedeuten, dass ein artifiziell erzeugtes Modellprotein mit sowohl Apicoplast *targeting* Information als auch ER *retrieval* Signal von zwei unterschiedlichen Rezeptoren innerhalb des selben Kompartimentes erkannt und gebunden werden kann (Abb. 4.1). Dies bedeutet auch, dass zwei gegensätzliche *targeting* Informationen im selben Kompartiment mit einander in Konflikt geraten. Die endgültige Lokalisierung des Proteins ist dabei abhängig von der relativen Affinität der Signale zu ihren jeweiligen Rezeptoren. Im Falle der beobachteten Varianz zwischen -KDEL und -SDEL vermittelter ER Rücksendung der Reporterproteine, würde dies bedeuten, dass eine -SDEL basierende Interaktion mit ERD2 die Transitpeptid - Transitpeptid Rezeptor Interaktion vollständig aufheben kann, während -KDEL (in Kombination mit einem funktionellen Transitpeptid) einer andauernden und nicht einseitig dominierten Konkurrenzsituation ausgesetzt ist. Entsprechend dieser Hypothese erfolgt die partielle Prozessierung -KDEL getaggtter Reporterproteine im Vergleich zu Reporterproteinen ohne ER *retrieval* Motiv zeitlich stark verzögert (Abb. 3.10; 3.11). Neu synthetisierte Reporterproteine ohne ER *retrieval* Sequenz werden innerhalb des bekannten Zeitrahmens der für einen Apicoplast Import benötigt wird (van Dooren et al., 2002) vollständig prozessiert (Abb. 3.10). Reporterproteine mit zusätzlicher -KDEL Sequenz werden zwar teilweise prozessiert, diese partielle Prozessierung findet jedoch über einen signifikant verlängerten Zeitraum statt (Abb. 3.10; 3.11). Diese zeitliche Verzögerung in der Prozessierung deutet darauf hin, dass -KDEL Reporterproteine aufgrund der anhaltenden Konkurrenzsituation zwischen Apicoplast *targeting* Information und ER *retrieval* Signal zunächst über einen verlängerten Zeitraum im sekretorischen Weg zurückgehalten werden, bevor sie schlussendlich zum Apicoplasten transportiert werden. Nach unserer Hypothese (Abb. 4.1) wird ein Teil der Reporterproteine zum Apicoplasten sortiert, während ein (Groß-) Teil zum ER zurückgeleitet wird. Diese zunächst zurückgeleiteten Proteine pendeln anschließend in sich wiederholenden Zyklen zwischen Golgi und ER, wobei in jedem Zyklus erneut die

Möglichkeit besteht vom putativen Transitpeptid-Rezeptor gebunden und zum Apicoplasten sortiert zu werden.

In Kombination mit durch zielgerichtete Mutagenese abgeschwächten oder nahezu funktionslosen Transitpeptiden (Abb. 3.6), steigt die -KDEL vermittelte Rücksendung der Reporterproteine zum ER des Parasiten mit abnehmender Stärke des Apicoplast *targeting* Signals (Abb. 3.7; 3.8; 3.9). Reporterproteine ohne konkurrierendes Transitpeptid, werden sowohl von der -SDEL, als auch von der -KDEL ER *retrieval* Sequenz effizient und vollständig zum ER zurückgeleitet (Abb. 3.5).

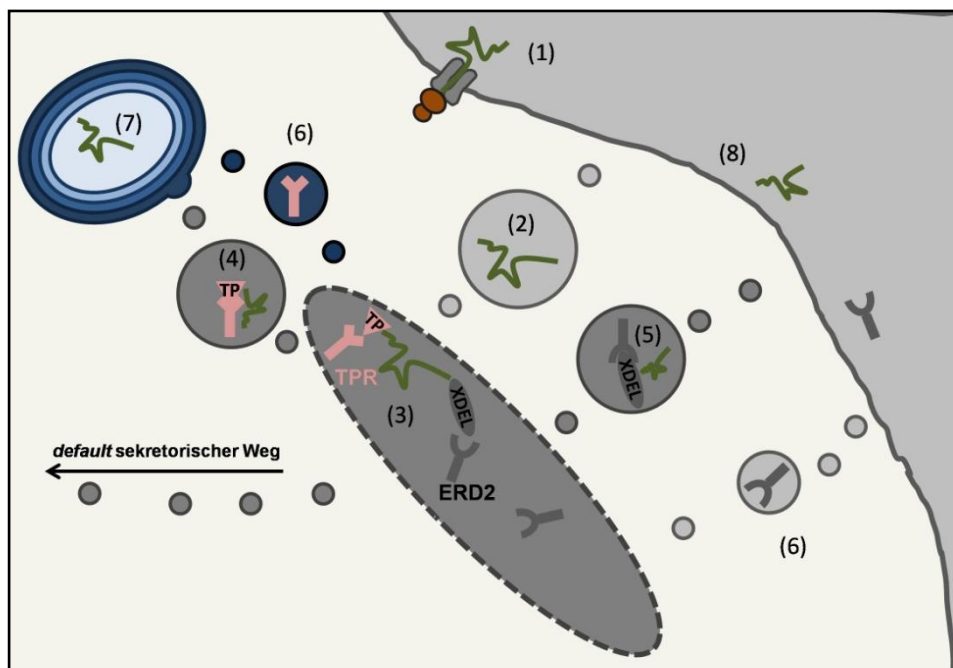


Abb. 4.1: Modell der kompetitiven *targeting* Informationen innerhalb des Golgi-Apparates.

Nach ihrer co-translationalen Insertion ins ER (1) werden Reporterproteine über Vesikel zum Golgi transportiert (2). Im Golgi werden sie über das Transitpeptid (TP) vom putativen Transitpeptid Rezeptor (TPR) und über die -xDEL Sequenz vom ERD2 Rezeptor gebunden (3). Abhängig von der Affinität der Signale zu ihren Rezeptoren, und damit der Stärke der Bindung, werden die Reporterproteine entweder vom TPR zum Apicoplasten (4) oder vom ERD2 Rezeptor zurück zum ER transportiert (5). Nach der Freisetzung ihrer Cargo Proteine im Zielkompartiment werden die Rezeptoren zum Golgi zurück transportiert, und können dort erneut Proteine binden (6). Im Apicoplasten erfolgt eine Prozessierung der Reporterproteine (7). Reporterproteine, die zum ER zurück geleitet wurden, werden erneut zum Golgi transportiert, und können dort mit den beiden unterschiedlichen Rezeptoren interagieren (8).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass ER *retrieval* Sequenzen, die üblicherweise im Golgi erkannt werden und dadurch den Rücktransport eines Proteins zum ER vermitteln, den Transport eines Reporterproteins zum Apicoplasten von *P. falciparum* negativ beeinflussen. Dies, und nicht zu letzt die uneinheitlichen Auswirkungen der unterschiedlichen ER *retrieval* Sequenzen auf die Lokalisierung / Prozessierung des Reporterproteins, lassen den Schluss zu, dass der Transport des hier untersuchten löslichen Apicoplast-gerichteten Reporterproteins eine Passage durch den Golgi-Apparat miteinschließt.

In einer früheren Studie wurde entgegen den hier präsentierten Ergebnissen postuliert, dass eine C-terminale -SDEL ER *retrieval* Sequenz den Transport eines nahezu identischen Apicoplast-gerichteten Reporterproteins in *P. falciparum* nicht verhindert (Tonkin et al., 2006b). Beim genaueren Betrachten der gezeigten Western Blot Analysen fällt jedoch auf, dass das detektierte Molekulargewicht des prozessierten Reporterproteins das Molekulargewicht eines entsprechenden Reporterproteins aber ohne Transitpeptid (nur Signalpeptid) unterschreitet (Tonkin et al., 2006b). Dies ist nur schwer zu erklären und könnte möglicherweise eher auf ein GFP-Degradationsprodukt, als auf ein tatsächlich prozessiertes Reporterprotein hindeuten. Auf persönliche Gespräche hin wurde uns freundlicherweise das verwendete Originalkonstrukt dieser Studie überlassen. In entsprechenden *P. falciparum* Transfektanten, die über eine Generation hinweg per Western Blot analysiert wurden, kann unter unseren Laborbedingungen keine Prozessierung des Reporterproteins detektiert werden (Anhang 2). Die beobachtete niedermolekulare Bande ist vergleichbar mit dem Molekulargewicht von in *E. coli* exprimiertem GFP alleine.

Im nahe verwandten apicomplexen Parasiten *Toxoplasma gondii* führt das Hinzufügen einer C-terminalen -HDEL ER *retrieval* Sequenz zu einer verminderten Prozessierung eines Apicoplast-gerichteten Reporterproteins im Vergleich zum identischen Reporterprotein ohne -HDEL Motiv (DeRocher et al., 2005). Die reduzierte Prozessierung (DeRocher et al., 2005) ist vergleichbar mit dem Effekt der -KDEL ER *retrieval* Sequenz auf die Prozessierung des Apicoplast-gerichteten Reporterproteins in *P. falciparum* (Abb. 3.3 B). Die mutierte Form eines mitochondrialen *T. gondii* Proteins, das zum Apicoplasten fehlgeleitet wird, kann darüberhinaus von einer ER *retrieval* Sequenz vollständig im ER zurückgehalten werden (Brydges and Carruthers, 2003). Zusammengefasst kann dies als eine unserem Modell entsprechende ähnliche Konkurrenzsituation zwischen *targeting* Informationen in einem sehr nahe verwandten Organismus gedeutet werden.

In der apicomplexen-verwandten Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* kann ein Reporterprotein mit mutiertem Transitpeptid, welches jedoch noch in der Lage ist den Transport zur Plastide zu vermitteln, von einem ER *retrieval* Signal ebenfalls effizient zurückgehalten werden (Apt et al., 2002). Die komplexe Plastide von Diatomeen ist wie der Apicoplast von 4 Membranen umgeben. Allerdings steht die äußere Membran in Kontinuum mit der ER Membran, was bedeutet, dass Plastiden-Proteine nach ihrer co-translationalen Insertion ins ER die äußere Plastiden Membran bereits überquert haben (Bhaya and Grossman, 1991; Hempel et al., 2007). Obwohl die Situation aufgrund dieses Unterschieds nicht exakt mit der in apicomplexen Parasiten vergleichbar ist, wird die Hypothese konkurrierender *targeting* Informationen dadurch ebenfalls unterstützt.

4.2 Brefeldin A hat einen negativen Einfluss auf den Proteintransport zum Apicoplasten von *P. falciparum*

Der Pilzmetabolit Brefeldin A interferiert mit dem sekretorischen Weg vieler eukaryotischer Organismen und wird deshalb häufig benutzt um sekretorische Prozesse innerhalb einer Zelle zu untersuchen. BFA bindet an Sec7 Domänen von Arf-GEFs und verhindert dadurch die Ausbildung von COPI Vesikeln des retrograden Golgi zu ER Transportweges. Als Folge dessen kollabiert der Golgi-Apparat und Golgi-abhängige sekretorische Prozesse kommen zum Erliegen (Lippincott-Schwartz et al., 1989; Peyroche et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter Einfluss von BFA der Transport eines löslichen Reporterproteins zum Apicoplasten von *P. falciparum* signifikant beeinträchtigt wird. Fluoreszierende Reporterproteine akkumulieren in Folge einer BFA Behandlung in der Peripherie des Zellkerns lebender Parasiten (Abb. 3.14 iii), was für einen gestörten Transportvorgang spricht. Dementsprechend kann in BFA-behandelten Parasiten anhand von Western Blot Analysen eine Anhäufung von unprozessiertem Reporterprotein im Vergleich zu unbehandelten Kontrollparasiten detektiert werden (Abb. 3.15). Es ist bekannt, dass frühe *Plasmodium* Ringstadien unter Einfluss von BFA reversibel in ihrer Entwicklung stagnieren (vgl. Abb. 3.14 ii), während spätere Stadien binnen einiger Stunden absterben. Dieses Phänomen wird als Folge eines noch nicht vollständig etablierten sekretorischen Transportsystems in metabolisch nur eingeschränkt aktiven jungen Ringformen diskutiert (Benting et al., 1994; Wickham et al., 2001). Dementsprechend ist die Anhäufung unprozessierter Reporterproteine in Folge einer länger als 4 Stunden andauernden BFA Behandlung später Ringformen oftmals vom Absterben der Parasiten begleitet (Abb. 3.15 A, B). Die Analyse neu synthetisierter radioaktiv markierter Proteine zeigt zudem, dass unter Einfluss von BFA innerhalb von 4 Stunden ein nur geringfügiger Anteil der Reporterproteine zum Apicoplasten transportiert und prozessiert wird, während in unbehandelten Kontrollparasiten bereits nach einer Stunde eine nahezu vollständige Prozessierung aller Reporterproteine erfolgt (Abb. 3.16). Dieser anhand verschiedener Untersuchungen offengelegte negative Effekt von BFA auf den Transport eines Apicoplast-gerichteten Reporterproteins, spricht dafür, dass eine BFA-induzierte Inhibition des Golgi-abhängigen sekretorischen Weges auch einen gestörten Transport zum Apicoplasten zur Folge hat. Zur weiteren Bestätigung dessen, wurde der Effekt von BFA auf ein identisches Reporterprotein, jedoch vor dem Hintergrund einer BFA-resistenten *P. falciparum* Zelllinie (Baumgartner et al., 2001) untersucht. Die Resistenz dieser Parasiten beruht auf einer Punktmutation zugrundeliegenden Methionin zu Isoleucin Substitution in der Sec7 Domäne eines vorhergesagten Arf-GEF (Baumgartner et al., 2001; Anhang 1). Unter Einfluss von BFA kann in diesen Parasiten keine Beeinträchtigung des Proteintransports zum Apicoplasten beobachtet werden. Weder fluoreszenzmikroskopisch noch anhand von Western Blot

Analysen ist eine Akkumulation nicht Apicoplast lokalisierter / unprozessierter Reporterproteine erkennbar (Abb. 3.13; 3.15). Die vollständige Prozessierung neu synthetisierter radioaktiv markierter Proteine erfolgt unabhängig von BFA innerhalb von einer Stunde (Abb. 3.17). Der BFA-induzierte Zusammenbruch des Golgi-abhängigen sekretorischen Weges in *P. falciparum* Wildtyp Parasiten führt zu einer massiven Beeinträchtigung des Proteintransports zum Apicoplasten, während in BFA-resistenten Parasiten (anhand der hier durchgeführten Untersuchungen) keinerlei Einschränkungen zu erkennen sind. Eine Beteiligung des Golgi-Apparates an diesem Transportvorgang ist deshalb sehr wahrscheinlich.

In einer früheren Studie (Tonkin et al., 2006b) wurde postuliert, dass der Transport eines nahezu identischen Reporterproteins zum Apicoplasten von *P. falciparum* von BFA nicht inhibiert wird und folglich Golgi-unabhängig erfolgt. Die Ergebnisse der in dieser Studie durchgeführten Pulse Chase Experimente (Tonkin et al., 2006b) stimmen mit den entsprechenden Ergebnissen der hier untersuchten Wildtyp Parasitenlinie überein (Abb. 3.16). Obwohl eine Prozessierung der Reporterproteine unter Einfluss von BFA nicht vollständig ausbleibt, erfolgt diese im Vergleich zu unbehandelten Kontrollparasiten zeitlich stark verzögert und unvollständig (Abb. 3.16 [Tonkin et al., 2006b]). Der BFA-insensitive Interpretationsansatz von Tonkin und Kollegen basiert maßgeblich darauf, dass eine Prozessierung unter BFA Einfluss überhaupt detektierbar ist; die damit einhergehende quantitative Reduzierung und zeitliche Verzögerung wird anhand von anderen Nebeneffekten von BFA auf das sekretorische System erklärt (Tonkin et al., 2006b). Vor allem unter Berücksichtigung der BFA-resistenten Zelllinie, in welcher eine verzögerte oder reduzierte Prozessierung nicht beobachtet werden kann (Abb. 3.15; 3.17), erscheint diese Erklärung jedoch nicht ausreichend. Beim nahe verwandten *Toxoplasma gondii* führt eine Behandlung mit BFA zum Ausbleiben der Prozessierung Apicoplast-gerichteter Reporterproteine, während der eigentliche Transport zur Plastide jedoch nicht beeinflusst wird (DeRocher et al., 2005). Als mögliche Erklärung werden Sec7-ähnliche Proteine diskutiert, die an der Translokation der Reporterproteine ins Innere des Apicoplasten beteiligt sind und von BFA inhibiert werden (DeRocher et al., 2005). Obwohl diese Erklärung im Falle von *T. gondii* zutreffend sein mag, erscheint sie für *P. falciparum* weniger plausibel, da im Genom von *P. falciparum* nur eine einzige Sec7 Domäne kodiert ist (Baumgartner et al., 2001; Wiek et al., 2004). Die Resistenz der hier verwendeten BFA-resistenten Zelllinie liegt einer einzigen Aminosäuren Substitution in dieser Sec7 Domäne zugrunde (Anhang 1; [Baumgartner et al., 2001]). Selbst wenn es bislang nicht identifizierte Sec7-ähnliche Angriffspunkte für BFA in *P. falciparum* geben sollte, oder die verzögerte Prozessierung in der Wildtyp Parasitenlinie auf einen von Tonkin und Kollegen vorgeschlagenen *off-target* Effekt von BFA zurückzuführen ist, wäre eine entsprechende Verzögerung auch in der BFA-

resistenten Zelllinie zu erwarten. Eine verzögerte oder reduzierte Prozessierung der Reporterproteine ist in dieser Parasitenlinie jedoch nicht ersichtlich (Abb. 3.15; 3.17). Obwohl die BFA-Resistenz unter zunehmendem Selektionsdruck generiert wurde und anschließende Sequenzanalysen nur im Hinblick auf die vorhergesagte Sec7 Domäne durchgeführt wurden (Baumgartner et al., 2001), sind andere (nicht identifizierte) Mutationen als Grundlage für die beobachteten Unterschiede eher unwahrscheinlich.

Fakt ist, dass anhand von Pulse Chase Analysen neu synthetisierte Proteine auch unter ständigem Einfluss von BFA nach einem verlängerten Zeitraum und zu einem geringen Anteil in prozessierter Form detektiert werden können (Abb. 3.16; [Tonkin et al., 2006b]). Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass während der BFA Behandlung tatsächlich keine *de novo* Prozessierung stattfindet, und die zu späteren Zeitpunkten detektierten prozessierten Reporterproteine denjenigen entsprechen, der bereits zum Zeitpunkt 0 in prozessierter Form vorhanden waren (Abb. 3.16). Diese mögliche Erklärung wirft jedoch auch unmittelbar die Frage auf, was mit den unprozessierten Ausgangsproteinen passiert, da eine Abnahme in der Intensität der detektierten Banden trotz allem ersichtlich ist (Abb. 3.16). Eine weitere Erklärung könnte sein, dass eine Prozessierung Apicoplast-gerichteter Reporterproteine auch unter Einfluss von BFA in reduzierter Form stattfinden kann. Möglicherweise erfolgt die BFA-induzierte Inhibition des sekretorischen Weges in individuellen Parasiten mehr oder weniger vollständig, oder eine marginale sekretorische Aktivität kann trotz BFA erhalten bleiben. Ebenfalls denkbar ist, dass mehrere, von einander unabhängige und möglicherweise Substrat-spezifische Transportwege zum Apicoplasten existieren. Obwohl nicht sehr naheliegend scheint, dass ein und das selbe Protein unter physiologischen Umständen über zwei unterschiedliche Wege zum Apicoplasten transportiert wird, besteht die Möglichkeit, dass aufgrund der Blockade des einen (konventionellen) Transportweges, ein alternatives (bereits bestehendes) Transportsystem in Anspruch genommen wird, welches möglicherweise in erster Linie anderen Substraten dient.

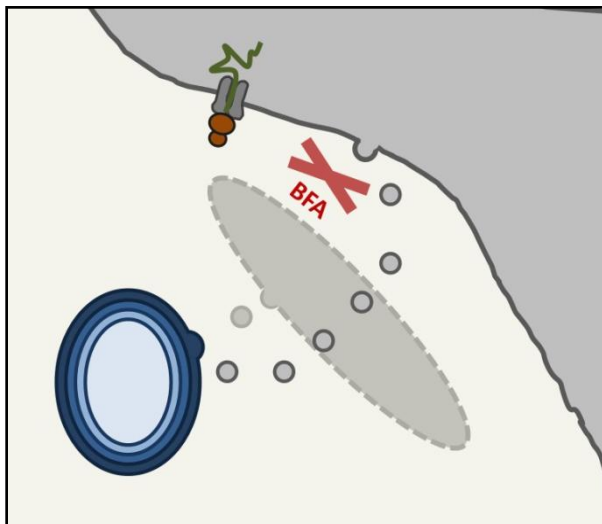


Abb. 4.2: Modell des Proteintransports zum Apicoplasten unter Einfluss von BFA.

Lösliche Apicoplast Proteine werden nach ihrer co-translationalen Insertion ins ER über Vesikel zum Golgi-Apparat transportiert, und von dort weiter zum Apicoplasten sortiert. BFA führt zu einer Blockade dieses konventionellen Transportweges. In Folge dessen wird ein alternatives, bereits bestehendes Transportsystem in Anspruch genommen.

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Der Golgi-Apparat bildet innerhalb des sekretorischen Weges ein Organell mit enormer Kapazität zur Erkennung, Modifizierung und Sortierung verschiedener sekretorischer Proteine (Wilson et al., 2011). Obwohl der Golgi von *P. falciparum* im Vergleich zu anderen höheren eukaryotischen Organismen morphologisch und möglicherweise auch funktionell reduziert ist, erfordert der Proteintransport zu sämtlichen bekannten sekretorischen Destinationen von *P. falciparum* einen Zwischenschritt durch dieses Kompartiment (Deponte et al., 2012). Darüberhinaus spielt der Golgi-Apparat eine Rolle beim Transport von Proteinen zu den einzigartigen Organellen von *Plasmodium*, wie der Nahrungsvakuole oder dem Apikalkomplex. Der Transport von für die Nahrungsvakuole bestimmten Proteinen erfolgt entlang des sekretorischen Weges und kann von BFA inhibiert werden (Banerjee et al., 2003; Dasaradhi et al., 2007; Klemba et al., 2004). Die Biogenese der Organellen des Apikalkomplex findet unter Mitwirkung des Golgi-Apparates statt und Proteine, die für diese Organellen bestimmt sind, werden ebenfalls vom ER über den Golgi zu ihrer Zieldestination transportiert (Bannister et al., 2000a, b; Deponte et al., 2012; Margos et al., 2004). In Anbetracht dieser vielfältigen Beteiligung des Golgi-Apparates am Transport von Proteinen in *P. falciparum*, scheint es naheliegend, dass auch eine Golgi-abhängiger Transportweg zum Apicoplasten existiert. In anderen Organismen mit komplexen Plastiden, wie den nahe verwandten Dinoflagellaten oder den entfernt verwandten *Euglena*, sind Golgi-abhängige Transportwege zur Plastide bereits bekannt (Nassoury et al., 2003; Nassoury and Morse, 2005; Sláviková et al., 2005; Sulli et al., 1999; Vacula et al., 2007). Auch im Falle des Proteintransports zu primären Plastiden der Pflanzen und Algen existieren alternative Transportwege, die über den Eintritt in den sekretorischen Weg und unter Beteiligung des Golgi-Apparates erfolgen (Burén et al., 2011; Hummel et al., 2010; Kitajima et al., 2009; Radhamony and Theg, 2006; Villarejo et al., 2005).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen eines löslichen Apicoplast-gerichteten Reporterproteins liefern vertretbare Hinweise auf die Existenz eines solchen Golgi-abhängigen Transportweges zum Apicoplasten von *P. falciparum*. Das zusätzliche Vorhandensein anderer Transportwege (unter Ausschluss des Golgi-Apparates) kann anhand der hier durchgeführten experimentellen Untersuchungen jedoch nicht ausgeschlossen werden. Um weitere Einblicke in den komplexen Transportvorgang von Apicoplast Proteinen zu erhalten, müssten ähnliche Studien an verschiedenen Proteinen (lösliche Proteine / Membranproteine) mit unterschiedlichen Zielkompartimenten innerhalb des Apicoplasten durchgeführt werden. Für eine stichhaltige Aussage ebenfalls notwendig wäre die Analyse unterschiedlicher Apicoplast Proteinen in ihrer vollen Länge, da nicht auszuschließen ist, dass bislang nicht identifizierte Apicoplast *targeting* Informationen über

die BTS hinaus existieren, die möglicherweise eine Sortierung in unterschiedliche Transportsysteme und -wege vermitteln. Ein weiterer Limitierungsfaktor für eine definitive Aussage ist die Über-Expression der verwendeten Reporterproteine unter der Kontrolle eines nicht endogenen konstitutiv aktiven Promotors. Die Transkriptlevel des endogenen ACP nehmen unmittelbar nach der Invasion eines Erythrozyten zunächst leicht ab, bis sie ca. 20 Stunden nach der Invasion stark ansteigen und ihren Höhepunkt im späten Trophozoiten/frühen Schizontenstadium erreichen (PlamoDB:PF3D7_0208500). Es ist nicht auszuschließen, dass bestimmte Transportsysteme zum Apicoplasten möglicherweise erst im Laufe des Entwicklungszyklus von *P. falciparum* vollständig etabliert werden, oder unterschiedliche Transportsysteme zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien bevorzugt aktiv sind. Die optimale Voraussetzung für fundierte Transportstudien wäre selbstverständlich die Untersuchung endogener Apicoplast Proteine. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen den Effekt von Brefeldin A auf endogenes ACP mittels Western Blot zu analysieren. Die maximalen Zelläquivalente, die technisch verarbeitet werden können, waren jedoch, vermutlich aufgrund der geringen Abundanz von Apicoplast Proteinen, kaum ausreichend um endogenes ACP zu detektieren. Für entsprechende Untersuchungen müsste zunächst eine Methodik etabliert werden, um zum Beispiel über differentielle Zellfraktionierung Apicoplasten anzureichern, so dass entsprechend mehr Zelläquivalente verarbeitet werden können.

Die Identifizierung eines Golgi-residenten Transitpeptid Rezeptors wäre ein eindeutiger Hinweis für einen Golgi-abhängigen Transportweg zum Apicoplasten von *P. falciparum*. Im Rahmen eines während dieser Arbeit betreuten Bachelor Projekts wurde versucht über *in vivo* Crosslink-Methoden potentielle Transitpeptid-bindende Proteine zu identifizieren. Leider war es nicht möglich optimale Konditionen zu etablieren unter denen Protein-Komplexe für weitere Analysen detektiert werden konnten. Desweiteren wurde der Versuch unternommen über synthetisch hergestellte repetitive Sequenzen von ACP Transitpeptiden interagierende Proteine aus Parasiten Lysaten zu isolieren und gegebenenfalls über Massenspektroskopie zu identifizieren. Leider war es in diesem Falle nicht möglich das rekombinante multi-Transitpeptid-Protein ausreichend zu solubilisieren und qualitativ aufzureinigen um entsprechende Pulldown Experimente durchführen zu können. Beide Ansätze könnten jedoch zur Identifizierung eines potentiellen Transitpeptid-Rezeptors beitragen und sollten deshalb weiter verfolgt werden.

5 Literaturverzeichnis

- Abu Bakar, N., N. Klonis, E. Hanssen, C. Chan, and L. Tilley, 2010, Digestive-vacuole genesis and endocytic processes in the early intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*: *J Cell Sci*, v. 123, p. 441-50.
- Adisa, A., F. R. Albano, J. Reeder, M. Foley, and L. Tilley, 2001, Evidence for a role for a *Plasmodium falciparum* homologue of Sec31p in the export of proteins to the surface of malaria parasite-infected erythrocytes: *J Cell Sci*, v. 114, p. 3377-86.
- Adisa, A., S. Frankland, M. Rug, K. Jackson, A. G. Maier, P. Walsh, T. Lithgow, N. Klonis, P. R. Gilson, A. F. Cowman, and L. Tilley, 2007, Re-assessing the locations of components of the classical vesicle-mediated trafficking machinery in transfected *Plasmodium falciparum*: *Int J Parasitol*, v. 37, p. 1127-41.
- Adl, S. M., B. S. Leander, A. G. Simpson, J. M. Archibald, O. R. Anderson, D. Bass, S. S. Bowser, G. Brugerolle, M. A. Farmer, S. Karpov, M. Kolisko, C. E. Lane, D. J. Lodge, D. G. Mann, R. Meisterfeld, L. Mendoza, Ø. Moestrup, S. E. Mozley-Standridge, A. V. Smirnov, and F. Spiegel, 2007, Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists: *Syst Biol*, v. 56, p. 684-9.
- Adl, S. M., A. G. Simpson, M. A. Farmer, R. A. Andersen, O. R. Anderson, J. R. Barta, S. S. Bowser, G. Brugerolle, R. A. Fensome, S. Fredericq, T. Y. James, S. Karpov, P. Kugrens, J. Krug, C. E. Lane, L. A. Lewis, J. Lodge, D. H. Lynn, D. G. Mann, R. M. McCourt, L. Mendoza, O. Moestrup, S. E. Mozley-Standridge, T. A. Nerad, C. A. Shearer, A. V. Smirnov, F. W. Spiegel, and M. F. Taylor, 2005, The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists: *J Eukaryot Microbiol*, v. 52, p. 399-451.
- Adl, S. M., A. G. Simpson, C. E. Lane, J. Lukeš, D. Bass, S. S. Bowser, M. W. Brown, F. Burki, M. Dunthorn, V. Hampl, A. Heiss, M. Hoppenrath, E. Lara, L. Le Gall, D. H. Lynn, H. McManus, E. A. Mitchell, S. E. Mozley-Standridge, L. W. Parfrey, J. Pawlowski, S. Rueckert, L. Shadwick, C. L. Schoch, A. Smirnov, and F. W. Spiegel, 2012, The revised classification of eukaryotes: *J Eukaryot Microbiol*, v. 59, p. 429-93.
- Agrawal, S., G. G. van Dooren, W. L. Beatty, and B. Striepen, 2009, Genetic evidence that an endosymbiont-derived endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD) system functions in import of apicoplast proteins: *J Biol Chem*, v. 284, p. 33683-91.
- Aikawa, M., 1971, Parasitological review. *Plasmodium*: the fine structure of malarial parasites: *Exp Parasitol*, v. 30, p. 284-320.
- Aikawa, M., P. K. Hepler, C. G. Huff, and H. Sprinz, 1966, The feeding mechanism of avian malarial parasites: *J Cell Biol*, v. 28, p. 355-73.
- Anantharaman, V., L. M. Iyer, S. Balaji, and L. Aravind, 2007, Adhesion molecules and other secreted host-interaction determinants in Apicomplexa: insights from comparative genomics: *Int Rev Cytol*, v. 262, p. 1-74.
- Andrès, C., B. Agne, and F. Kessler, 2010, The TOC complex: preprotein gateway to the chloroplast: *Biochim Biophys Acta*, v. 1803, p. 715-23.
- Angrisano, F., Y. H. Tan, A. Sturm, G. I. McFadden, and J. Baum, 2012, Malaria parasite colonisation of the mosquito midgut--placing the *Plasmodium* ookinete centre stage: *Int J Parasitol*, v. 42, p. 519-27.
- Apt, K. E., L. Zaslavkaia, J. C. Lippmeier, M. Lang, O. Kilian, R. Wetherbee, A. R. Grossman, and P. G. Kroth, 2002, In vivo characterization of diatom multipartite plastid targeting signals: *J Cell Sci*, v. 115, p. 4061-9.
- Archibald, J. M., 2009, The puzzle of plastid evolution: *Curr Biol*, v. 19, p. R81-8.
- Ayong, L., G. Pagnotti, A. B. Tobon, and D. Chakrabarti, 2007, Identification of *Plasmodium falciparum* family of SNAREs: *Mol Biochem Parasitol*, v. 152, p. 113-22.
- Ayong, L., A. Raghavan, T. G. Schneider, T. F. Taraschi, D. A. Fidock, and D. Chakrabarti, 2009, The longin domain regulates the steady-state dynamics of Sec22 in *Plasmodium falciparum*: *Eukaryot Cell*, v. 8, p. 1330-40.

- Bagola, K., M. Mehnert, E. Jarosch, and T. Sommer, 2011, Protein dislocation from the ER: *Biochim Biophys Acta*, v. 1808, p. 925-36.
- Baldassarre, M., A. Dragonetti, P. Marra, A. Luini, C. Isidoro, and R. Buccione, 2000, Regulation of protein sorting at the TGN by plasma membrane receptor activation: *J Cell Sci*, v. 113 (Pt 4), p. 741-8.
- Banerjee, R., S. E. Francis, and D. E. Goldberg, 2003, Food vacuole plasmepsins are processed at a conserved site by an acidic convertase activity in *Plasmodium falciparum*: *Mol Biochem Parasitol*, v. 129, p. 157-65.
- Bannister, L. H., J. M. Hopkins, R. E. Fowler, S. Krishna, and G. H. Mitchell, 2000a, A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages: *Parasitol Today*, v. 16, p. 427-33.
- Bannister, L. H., J. M. Hopkins, R. E. Fowler, S. Krishna, and G. H. Mitchell, 2000b, Ultrastructure of rhoptry development in *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizonts: *Parasitology*, v. 121 (Pt 3), p. 273-87.
- Bannister, L. H., J. M. Hopkins, G. Margos, A. R. Dlugowski, and G. H. Mitchell, 2004, Three-dimensional ultrastructure of the ring stage of *Plasmodium falciparum*: evidence for export pathways: *Microsc Microanal*, v. 10, p. 551-62.
- Bannister, L. H., and G. H. Mitchell, 1995, The role of the cytoskeleton in *Plasmodium falciparum* merozoite biology: an electron-microscopic view: *Ann Trop Med Parasitol*, v. 89, p. 105-11.
- Bannykh, S. I., T. Rowe, and W. E. Balch, 1996, The organization of endoplasmic reticulum export complexes: *J Cell Biol*, v. 135, p. 19-35.
- Barlowe, C., 2002, COPII-dependent transport from the endoplasmic reticulum: *Curr Opin Cell Biol*, v. 14, p. 417-22.
- Baruch, D. I., B. L. Pasloske, H. B. Singh, X. Bi, X. C. Ma, M. Feldman, T. F. Taraschi, and R. J. Howard, 1995, Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes: *Cell*, v. 82, p. 77-87.
- Baum, J., D. Richard, J. Healer, M. Rug, Z. Krnajska, T. W. Gilberger, J. L. Green, A. A. Holder, and A. F. Cowman, 2006, A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility across malaria life cycle stages and other apicomplexan parasites: *J Biol Chem*, v. 281, p. 5197-208.
- Baumeister, S., J. Wiesner, A. Reichenberg, M. Hintz, S. Bietz, O. S. Harb, D. S. Roos, M. Kordes, J. Friesen, K. Matuschewski, K. Lingelbach, H. Jomaa, and F. Seeber, 2011, Fosmidomycin uptake into *Plasmodium* and *Babesia*-infected erythrocytes is facilitated by parasite-induced new permeability pathways: *PLoS One*, v. 6, p. e19334.
- Baumeister, S., M. Winterberg, C. Duranton, S. M. Huber, F. Lang, K. Kirk, and K. Lingelbach, 2006, Evidence for the involvement of *Plasmodium falciparum* proteins in the formation of new permeability pathways in the erythrocyte membrane: *Mol Microbiol*, v. 60, p. 493-504.
- Baumgartner, F., S. Wiek, K. Paprotka, S. Zauner, and K. Lingelbach, 2001, A point mutation in an unusual Sec7 domain is linked to brefeldin A resistance in a *Plasmodium falciparum* line generated by drug selection: *Mol Microbiol*, v. 41, p. 1151-8.
- Beaumelle, B. D., H. J. Vial, and J. R. Philippot, 1987, Reevaluation, using marker enzymes, of the ability of saponin and ammonium chloride to free *Plasmodium* from infected erythrocytes: *J Parasitol*, v. 73, p. 743-8.
- Beck, H. P., D. Blake, M. L. Dardé, I. Felger, S. Pedraza-Díaz, J. Regidor-Cerrillo, M. Gómez-Bautista, L. M. Ortega-Mora, L. Putignani, B. Shiels, A. Tait, and W. Weir, 2009a, Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites: *Int J Parasitol*, v. 39, p. 175-89.
- Beck, R., M. Rawet, M. Ravet, F. T. Wieland, and D. Cassel, 2009b, The COPI system: molecular mechanisms and function: *FEBS Lett*, v. 583, p. 2701-9.
- Bender, A., G. G. van Dooren, S. A. Ralph, G. I. McFadden, and G. Schneider, 2003, Properties and prediction of mitochondrial transit peptides from *Plasmodium falciparum*: *Mol Biochem Parasitol*, v. 132, p. 59-66.
- Benting, J., D. Mattei, and K. Lingelbach, 1994, Brefeldin A inhibits transport of the glycophorin-binding protein from *Plasmodium falciparum* into the host erythrocyte: *Biochem J*, v. 300 (Pt 3), p. 821-6.

- Bhattacharjee, S., C. van Ooij, B. Balu, J. H. Adams, and K. Haldar, 2008, Maurer's clefts of *Plasmodium falciparum* are secretory organelles that concentrate virulence protein reporters for delivery to the host erythrocyte: *Blood*, v. 111, p. 2418-26.
- Bhaya, D., and A. Grossman, 1991, Targeting proteins to diatom plastids involves transport through an endoplasmic reticulum: *Mol Gen Genet*, v. 229, p. 400-4.
- Bietz, S., I. Montilla, S. Külzer, J. M. Przyborski, and K. Lingelbach, 2009, Recruitment of human aquaporin 3 to internal membranes in the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte: *Mol Biochem Parasitol*, v. 167, p. 48-53.
- Blackman, M. J., and L. H. Bannister, 2001, Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation: *Mol Biochem Parasitol*, v. 117, p. 11-25.
- Blobel, G., and B. Dobberstein, 1975a, Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma: *J Cell Biol*, v. 67, p. 835-51.
- Blobel, G., and B. Dobberstein, 1975b, Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components: *J Cell Biol*, v. 67, p. 852-62.
- Borst, P., J. P. Overdulve, P. J. Weijers, F. Fase-Fowler, and M. Van den Berg, 1984, DNA circles with cruciforms from *Isospora* (*Toxoplasma*) *gondii*: *Biochim Biophys Acta*, v. 781, p. 100-11.
- Bray, P. G., S. A. Ward, and P. M. O'Neill, 2005, Quinolines and artemisinin: chemistry, biology and history: *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 295, p. 3-38.
- Brydges, S. D., and V. B. Carruthers, 2003, Mutation of an unusual mitochondrial targeting sequence of SODB2 produces multiple targeting fates in *Toxoplasma gondii*: *J Cell Sci*, v. 116, p. 4675-85.
- Bullmann, L., R. Haarmann, O. Mirus, R. Bredemeier, F. Hempel, U. G. Maier, and E. Schleiff, 2010, Filling the gap, evolutionarily conserved Omp85 in plastids of chromalveolates: *J Biol Chem*, v. 285, p. 6848-56.
- Burki, F., N. Okamoto, J. F. Pombert, and P. J. Keeling, 2012, The evolutionary history of haptophytes and cryptophytes: phylogenomic evidence for separate origins: *Proc Biol Sci*, v. 279, p. 2246-54.
- Burén, S., C. Ortega-Villasante, A. Blanco-Rivero, A. Martínez-Bernardini, T. Shutova, D. Shevela, J. Messinger, L. Bako, A. Villarejo, and G. Samuelsson, 2011, Importance of post-translational modifications for functionality of a chloroplast-localized carbonic anhydrase (CAH1) in *Arabidopsis thaliana*: *PLoS One*, v. 6, p. e21021.
- Carlson, J., G. B. Nash, V. Gabutti, F. al-Yaman, and M. Wahlgren, 1994, Natural protection against severe *Plasmodium falciparum* malaria due to impaired rosette formation: *Blood*, v. 84, p. 3909-14.
- Cassera, M. B., F. C. Gozzo, F. L. D'Alessandri, E. F. Merino, H. A. del Portillo, V. J. Peres, I. C. Almeida, M. N. Eberlin, G. Wunderlich, J. Wiesner, H. Jomaa, E. A. Kimura, and A. M. Katzin, 2004, The methylerythritol phosphate pathway is functionally active in all intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*: *J Biol Chem*, v. 279, p. 51749-59.
- Cavalier-Smith, T., 1999, Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree: *J Eukaryot Microbiol*, v. 46, p. 347-66.
- Cavalier-Smith, T., 2003, Genomic reduction and evolution of novel genetic membranes and protein-targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae): *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 358, p. 109-33; discussion 133-4.
- Chardin, P., S. Paris, B. Antonny, S. Robineau, S. Béraud-Dufour, C. L. Jackson, and M. Chabre, 1996, A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains: *Nature*, v. 384, p. 481-4.
- Cheng, Q., D. E. Kyle, and M. L. Gatton, 2012, Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*: A process linked to dormancy?: *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, v. 2, p. 249-255.
- Chung, D. W., N. Ponts, J. Prudhomme, E. M. Rodrigues, and K. G. Le Roch, 2012, Characterization of the ubiquitylating components of the human malaria parasite's protein degradation pathway: *PLoS One*, v. 7, p. e43477.

- Combrinck, J. M., T. E. Mabotha, K. K. Ncokazi, M. A. Ambele, D. Taylor, P. J. Smith, H. C. Hoppe, and T. J. Egan, 2013, Insights into the role of heme in the mechanism of action of antimalarials: *ACS Chem Biol*, v. 8, p. 133-7.
- Couffin, S., R. Hernandez-Rivas, T. Blisnick, and D. Mattei, 1998, Characterisation of PfSec61, a *Plasmodium falciparum* homologue of a component of the translocation machinery at the endoplasmic reticulum membrane of eukaryotic cells: *Mol Biochem Parasitol*, v. 92, p. 89-98.
- Cowman, A. F., D. Berry, and J. Baum, 2012, The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell: *J Cell Biol*, v. 198, p. 961-71.
- Cowman, A. F., and B. S. Crabb, 2006, Invasion of red blood cells by malaria parasites: *Cell*, v. 124, p. 755-66.
- Cowman, A. F., S. Karcz, D. Galatis, and J. G. Culvenor, 1991, A P-glycoprotein homologue of *Plasmodium falciparum* is localized on the digestive vacuole: *J Cell Biol*, v. 113, p. 1033-42.
- Cox, F. E., 2010, History of the discovery of the malaria parasites and their vectors: *Parasit Vectors*, v. 3, p. 5.
- Cox-Singh, J., T. M. Davis, K. S. Lee, S. S. Shamsul, A. Matusop, S. Ratnam, H. A. Rahman, D. J. Conway, and B. Singh, 2008, *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening: *Clin Infect Dis*, v. 46, p. 165-71.
- Crabb, B. S., B. M. Cooke, J. C. Reeder, R. F. Waller, S. R. Caruana, K. M. Davern, M. E. Wickham, G. V. Brown, R. L. Coppel, and A. F. Cowman, 1997, Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress: *Cell*, v. 89, p. 287-96.
- Dalbey, R. E., and G. Von Heijne, 1992, Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes--a new protease family: *Trends Biochem Sci*, v. 17, p. 474-8.
- Dancourt, J., and C. Barlowe, 2010, Protein sorting receptors in the early secretory pathway: *Annu Rev Biochem*, v. 79, p. 777-802.
- Dasaradhi, P. V., R. Korde, J. K. Thompson, C. Tanwar, T. C. Nag, V. S. Chauhan, A. F. Cowman, A. Mohammed, and P. Malhotra, 2007, Food vacuole targeting and trafficking of falcipain-2, an important cysteine protease of human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: *Mol Biochem Parasitol*, v. 156, p. 12-23.
- de Castro, F. A., G. E. Ward, R. Jambou, G. Attal, V. Mayau, G. Jaureguiberry, C. Braun-Breton, D. Chakrabarti, and G. Langsley, 1996, Identification of a family of Rab G-proteins in *Plasmodium falciparum* and a detailed characterisation of pfrab6: *Mol Biochem Parasitol*, v. 80, p. 77-88.
- De Matteis, M. A., and A. Luini, 2008, Exiting the Golgi complex: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 9, p. 273-84.
- De Souza, W., 1995, Structural organization of the cell surface of pathogenic protozoa: *Micron*, v. 26, p. 405-30.
- Deponte, M., H. C. Hoppe, M. C. Lee, A. G. Maier, D. Richard, M. Rug, T. Spielmann, and J. M. Przyborski, 2012, Wherever I may roam: protein and membrane trafficking in *P. falciparum*-infected red blood cells: *Mol Biochem Parasitol*, v. 186, p. 95-116.
- DeRocher, A., B. Gilbert, J. E. Feagin, and M. Parsons, 2005, Dissection of brefeldin A-sensitive and -insensitive steps in apicoplast protein targeting: *J Cell Sci*, v. 118, p. 565-74.
- DeRocher, A., C. B. Hagen, J. E. Froehlich, J. E. Feagin, and M. Parsons, 2000, Analysis of targeting sequences demonstrates that trafficking to the *Toxoplasma gondii* plastid branches off the secretory system: *J Cell Sci*, v. 113 (Pt 22), p. 3969-77.
- DeRocher, A. E., I. Coppens, A. Karnataki, L. A. Gilbert, M. E. Rome, J. E. Feagin, P. J. Bradley, and M. Parsons, 2008, A thioredoxin family protein of the apicoplast periphery identifies abundant candidate transport vesicles in *Toxoplasma gondii*: *Eukaryot Cell*, v. 7, p. 1518-29.
- DeRocher, A. E., A. Karnataki, P. Vaney, and M. Parsons, 2012, Apicoplast targeting of a *Toxoplasma gondii* transmembrane protein requires a cytosolic tyrosine-based motif: *Traffic*, v. 13, p. 694-704.
- Dixon, M. W., M. K. Dearnley, E. Hanssen, T. Gilberger, and L. Tilley, 2012, Shape-shifting gametocytes: how and why does *P. falciparum* go banana-shaped?: *Trends Parasitol*, v. 28, p. 471-8.

- Dondorp, A. M., F. Nosten, P. Yi, D. Das, A. P. Phyto, J. Tarning, K. M. Lwin, F. Arie, W. Hanpithakpong, S. J. Lee, P. Ringwald, K. Silamut, M. Imwong, K. Chotivanich, P. Lim, T. Herdman, S. S. An, S. Yeung, P. Singhasivanon, N. P. Day, N. Lindegardh, D. Socheat, and N. J. White, 2009, Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria: *N Engl J Med*, v. 361, p. 455-67.
- Douglas, S., S. Zauner, M. Fraunholz, M. Beaton, S. Penny, L. T. Deng, X. Wu, M. Reith, T. Cavalier-Smith, and U. G. Maier, 2001, The highly reduced genome of an enslaved algal nucleus: *Nature*, v. 410, p. 1091-6.
- Douzery, E. J., E. A. Snell, E. Baptiste, F. Delsuc, and H. Philippe, 2004, The timing of eukaryotic evolution: does a relaxed molecular clock reconcile proteins and fossils?: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, p. 15386-91.
- Dubey, J. P., and G. Scharf, 2011, Neosporosis in animals--the last five years: *Vet Parasitol*, v. 180, p. 90-108.
- Eastman, R. T., and D. A. Fidock, 2009, Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria: *Nat Rev Microbiol*, v. 7, p. 864-74.
- Elford, B. C., G. M. Cowan, and D. J. Ferguson, 1995, Parasite-regulated membrane transport processes and metabolic control in malaria-infected erythrocytes: *Biochem J*, v. 308 (Pt 2), p. 361-74.
- Ellgaard, L., and A. Helenius, 2003, Quality control in the endoplasmic reticulum: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 4, p. 181-91.
- Ellgaard, L., M. Molinari, and A. Helenius, 1999, Setting the standards: quality control in the secretory pathway: *Science*, v. 286, p. 1882-8.
- Ellis, K. E., B. Clough, J. W. Saldanha, and R. J. Wilson, 2001, Nifs and Sufs in malaria: *Mol Microbiol*, v. 41, p. 973-81.
- Elmendorf, H. G., and K. Haldar, 1993, Identification and localization of ERD2 in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: separation from sites of sphingomyelin synthesis and implications for organization of the Golgi: *EMBO J*, v. 12, p. 4763-73.
- Elmendorf, H. G., and K. Haldar, 1994, *Plasmodium falciparum* exports the Golgi marker sphingomyelin synthase into a tubovesicular network in the cytoplasm of mature erythrocytes: *J Cell Biol*, v. 124, p. 449-62.
- Fairhurst, R. M., G. M. Nanyar, J. G. Breman, R. Hallett, J. L. Vennerstrom, S. Duong, P. Ringwald, T. E. Wellems, C. V. Plowe, and A. M. Dondorp, 2012, Artemisinin-resistant malaria: research challenges, opportunities, and public health implications: *Am J Trop Med Hyg*, v. 87, p. 231-41.
- Felsner, G., M. S. Sommer, N. Gruenheit, F. Hempel, D. Moog, S. Zauner, W. Martin, and U. G. Maier, 2011, ERAD components in organisms with complex red plastids suggest recruitment of a preexisting protein transport pathway for the periplastid membrane: *Genome Biol Evol*, v. 3, p. 140-50.
- Fichera, M. E., and D. S. Roos, 1997, A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites: *Nature*, v. 390, p. 407-9.
- Fidock, D. A., T. Nomura, A. K. Talley, R. A. Cooper, S. M. Dzekunov, M. T. Ferdig, L. M. Ursos, A. B. Sidhu, B. Naudé, K. W. Deitsch, X. Z. Su, J. C. Wootton, P. D. Roepe, and T. E. Wellems, 2000, Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance: *Mol Cell*, v. 6, p. 861-71.
- Foth, B. J., S. A. Ralph, C. J. Tonkin, N. S. Struck, M. Fraunholz, D. S. Roos, A. F. Cowman, and G. I. McFadden, 2003, Dissecting apicoplast targeting in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: *Science*, v. 299, p. 705-8.
- Francis, S. E., D. J. Sullivan, and D. E. Goldberg, 1997, Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: *Annu Rev Microbiol*, v. 51, p. 97-123.
- Funes, S., E. Davidson, A. Reyes-Prieto, S. Magallón, P. Herion, M. P. King, and D. González-Halphen, 2002, A green algal apicoplast ancestor: *Science*, v. 298, p. 2155.
- Gachohi, J., R. Skilton, F. Hansen, P. Ngumi, and P. Kitale, 2012, Epidemiology of East Coast fever (*Theileria parva* infection) in Kenya: past, present and the future: *Parasit Vectors*, v. 5, p. 194.

- Gallagher, J. R., K. A. Matthews, and S. T. Prigge, 2011, Plasmodium falciparum apicoplast transit peptides are unstructured in vitro and during apicoplast import: *Traffic*, v. 12, p. 1124-38.
- Garcia-Bustos, J. F., and F. J. Gamo, 2013, Antimalarial drug resistance and early drug discovery: *Curr Pharm Des*, v. 19, p. 270-81.
- Gardner, M. J., P. A. Bates, I. T. Ling, D. J. Moore, S. McCready, M. B. Gunasekera, R. J. Wilson, and D. H. Williamson, 1988, Mitochondrial DNA of the human malarial parasite *Plasmodium falciparum*: *Mol Biochem Parasitol*, v. 31, p. 11-7.
- Gardner, M. J., J. E. Feagin, D. J. Moore, K. Rangachari, D. H. Williamson, and R. J. Wilson, 1993, Sequence and organization of large subunit rRNA genes from the extrachromosomal 35 kb circular DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: *Nucleic Acids Res*, v. 21, p. 1067-71.
- Gardner, M. J., J. E. Feagin, D. J. Moore, D. F. Spencer, M. W. Gray, D. H. Williamson, and R. J. Wilson, 1991a, Organisation and expression of small subunit ribosomal RNA genes encoded by a 35-kilobase circular DNA in *Plasmodium falciparum*: *Mol Biochem Parasitol*, v. 48, p. 77-88.
- Gardner, M. J., N. Goldman, P. Barnett, P. W. Moore, K. Rangachari, M. Strath, A. Whyte, D. H. Williamson, and R. J. Wilson, 1994, Phylogenetic analysis of the *rpoB* gene from the plastid-like DNA of *Plasmodium falciparum*: *Mol Biochem Parasitol*, v. 66, p. 221-31.
- Gardner, M. J., N. Hall, E. Fung, O. White, M. Berriman, R. W. Hyman, J. M. Carlton, A. Pain, K. E. Nelson, S. Bowman, I. T. Paulsen, K. James, J. A. Eisen, K. Rutherford, S. L. Salzberg, A. Craig, S. Kyes, M. S. Chan, V. Nene, S. J. Shallom, B. Suh, J. Peterson, S. Angiuoli, M. Pertea, J. Allen, J. Selengut, D. Haft, M. W. Mather, A. B. Vaidya, D. M. Martin, A. H. Fairlamb, M. J. Fraunholz, D. S. Roos, S. A. Ralph, G. I. McFadden, L. M. Cummings, G. M. Subramanian, C. Mungall, J. C. Venter, D. J. Carucci, S. L. Hoffman, C. Newbold, R. W. Davis, C. M. Fraser, and B. Barrell, 2002, Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: *Nature*, v. 419, p. 498-511.
- Gardner, M. J., D. H. Williamson, and R. J. Wilson, 1991b, A circular DNA in malaria parasites encodes an RNA polymerase like that of prokaryotes and chloroplasts: *Mol Biochem Parasitol*, v. 44, p. 115-23.
- Gehde, N., C. Hinrichs, I. Montilla, S. Charpian, K. Lingelbach, and J. M. Przyborski, 2009, Protein unfolding is an essential requirement for transport across the parasitophorous vacuolar membrane of *Plasmodium falciparum*: *Mol Microbiol*, v. 71, p. 613-28.
- Gillingham, A. K., and S. Munro, 2007, The small G proteins of the Arf family and their regulators: *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 23, p. 579-611.
- Glaser, S., G. G. van Dooren, S. Agrawal, C. F. Brooks, G. I. McFadden, B. Striepen, and M. K. Higgins, 2012, Tic22 is an essential chaperone required for protein import into the apicoplast: *J Biol Chem*, v. 287, p. 39505-12.
- Goldberg, D. E., 2005, Hemoglobin degradation: *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 295, p. 275-91.
- Goldberg, D. E., A. F. Slater, R. Beavis, B. Chait, A. Cerami, and G. B. Henderson, 1991, Hemoglobin degradation in the human malaria pathogen *Plasmodium falciparum*: a catabolic pathway initiated by a specific aspartic protease: *J Exp Med*, v. 173, p. 961-9.
- Goodman, C. D., and G. I. McFadden, 2012, Targeting apicoplasts in malaria parasites: *Expert Opin Ther Targets*.
- Gould, S. B., M. S. Sommer, K. Hadfi, S. Zauner, P. G. Kroth, and U. G. Maier, 2006, Protein targeting into the complex plastid of cryptophytes: *J Mol Evol*, v. 62, p. 674-81.
- Gould, S. B., R. F. Waller, and G. I. McFadden, 2008, Plastid evolution: *Annu Rev Plant Biol*, v. 59, p. 491-517.
- Gowda, D. C., and E. A. Davidson, 1999, Protein glycosylation in the malaria parasite: *Parasitol Today*, v. 15, p. 147-52.
- Gray, J., A. Zintl, A. Hildebrandt, K. P. Hunfeld, and L. Weiss, 2010, Zoonotic babesiosis: overview of the disease and novel aspects of pathogen identity: *Ticks Tick Borne Dis*, v. 1, p. 3-10.
- Green, B. R., 2011, After the primary endosymbiosis: an update on the chromalveolate hypothesis and the origins of algae with Chl c: *Photosynth Res*, v. 107, p. 103-15.

- Grigg, M. E., and N. Sundar, 2009, Sexual recombination punctuated by outbreaks and clonal expansions predicts *Toxoplasma gondii* population genetics: *Int J Parasitol*, v. 39, p. 925-33.
- Gruber, A., S. Vugrinec, F. Hempel, S. B. Gould, U. G. Maier, and P. G. Kroth, 2007, Protein targeting into complex diatom plastids: functional characterisation of a specific targeting motif: *Plant Mol Biol*, v. 64, p. 519-30.
- Gubbels, M. J., and M. T. Duraisingh, 2012, Evolution of apicomplexan secretory organelles: *Int J Parasitol*, v. 42, p. 1071-81.
- Hanssen, E., P. Carlton, S. Deed, N. Klonis, J. Sedat, J. DeRisi, and L. Tilley, 2010a, Whole cell imaging reveals novel modular features of the exomembrane system of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: *Int J Parasitol*, v. 40, p. 123-34.
- Hanssen, E., C. Dekiwadia, D. T. Riglar, M. Rug, L. Lemgruber, A. F. Cowman, M. Cyrklaff, M. Kudryashev, F. Frischknecht, J. Baum, and S. A. Ralph, 2013, Electron tomography of *Plasmodium falciparum* merozoites reveals core cellular events that underpin erythrocyte invasion: *Cell Microbiol*.
- Hanssen, E., P. J. McMillan, and L. Tilley, 2010b, Cellular architecture of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: *Int J Parasitol*, v. 40, p. 1127-35.
- Harb, O. S., B. Chatterjee, M. J. Fraunholz, M. J. Crawford, M. Nishi, and D. S. Roos, 2004, Multiple functionally redundant signals mediate targeting to the apicoplast in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*: *Eukaryot Cell*, v. 3, p. 663-74.
- Hayton, K., and X. Z. Su, 2008, Drug resistance and genetic mapping in *Plasmodium falciparum*: *Curr Genet*, v. 54, p. 223-39.
- He, C. Y., M. K. Shaw, C. H. Pletcher, B. Striepen, L. G. Tilney, and D. S. Roos, 2001, A plastid segregation defect in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*: *EMBO J*, v. 20, p. 330-9.
- Helenius, A., and M. Aebi, 2001, Intracellular functions of N-linked glycans: *Science*, v. 291, p. 2364-9.
- Hempel, F., A. Bozarth, M. S. Sommer, S. Zauner, J. M. Przyborski, and U. G. Maier, 2007, Transport of nuclear-encoded proteins into secondarily evolved plastids: *Biol Chem*, v. 388, p. 899-906.
- Hempel, F., L. Bullmann, J. Lau, S. Zauner, and U. G. Maier, 2009, ERAD-derived preprotein transport across the second outermost plastid membrane of diatoms: *Mol Biol Evol*, v. 26, p. 1781-90.
- Hempel, F., G. Felsner, and U. G. Maier, 2010, New mechanistic insights into pre-protein transport across the second outermost plastid membrane of diatoms: *Mol Microbiol*, v. 76, p. 793-801.
- Hernández-Rivas, R., A. M. Herrera-Solorio, M. Sierra-Miranda, D. M. Delgadillo, and M. Vargas, 2013, Impact of chromosome ends on the biology and virulence of *Plasmodium falciparum*: *Mol Biochem Parasitol*, v. 187, p. 121-8.
- Hopkins, J., R. Fowler, S. Krishna, I. Wilson, G. Mitchell, and L. Bannister, 1999, The plastid in *Plasmodium falciparum* asexual blood stages: a three-dimensional ultrastructural analysis: *Protist*, v. 150, p. 283-95.
- Horrocks, P., R. A. Pinches, S. J. Chakravorty, J. Papakrivos, Z. Christodoulou, S. A. Kyes, B. C. Urban, D. J. Ferguson, and C. I. Newbold, 2005, PfEMP1 expression is reduced on the surface of knobless *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes: *J Cell Sci*, v. 118, p. 2507-18.
- Hoseki, J., R. Ushioda, and K. Nagata, 2010, Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation: *J Biochem*, v. 147, p. 19-25.
- Huber, S. M., A. C. Uhlemann, N. L. Gamper, C. Duranton, P. G. Kremsner, and F. Lang, 2002, *Plasmodium falciparum* activates endogenous Cl(-) channels of human erythrocytes by membrane oxidation: *EMBO J*, v. 21, p. 22-30.
- Hummel, E., A. Osterrieder, D. G. Robinson, and C. Hawes, 2010, Inhibition of Golgi function causes plastid starch accumulation: *J Exp Bot*, v. 61, p. 2603-14.
- Imwong, M., G. Snounou, S. Pukrittayakamee, N. Tanomsing, J. R. Kim, A. Nandy, J. P. Guthmann, F. Nosten, J. Carlton, S. Looareesuwan, S. Nair, D. Sudimack, N. P. Day, T. J. Anderson, and N. J. White, 2007, Relapses of *Plasmodium vivax* infection usually result from activation of heterologous hypnozoites: *J Infect Dis*, v. 195, p. 927-33.
- Jackson, C. L., and J. E. Casanova, 2000, Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors: *Trends Cell Biol*, v. 10, p. 60-7.
- Jahn, R., T. Lang, and T. C. Südhof, 2003, Membrane fusion: *Cell*, v. 112, p. 519-33.

- Janouskovec, J., A. Horák, M. Oborník, J. Lukes, and P. J. Keeling, 2010, A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate, and heterokont plastids: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 107, p. 10949-54.
- Johnson, A. E., and M. A. van Waes, 1999, The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane: *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 15, p. 799-842.
- Jomaa, H., J. Wiesner, S. Sanderbrand, B. Altincicek, C. Weidemeyer, M. Hintz, I. Türbachova, M. Eberl, J. Zeidler, H. K. Lichtenthaler, D. Soldati, and E. Beck, 1999, Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs: *Science*, v. 285, p. 1573-6.
- Kalanon, M., C. J. Tonkin, and G. I. McFadden, 2009, Characterization of two putative protein translocation components in the apicoplast of *Plasmodium falciparum*: *Eukaryot Cell*, v. 8, p. 1146-54.
- Kamchonwongpaisan, S., E. Samoff, and S. R. Meshnick, 1997, Identification of hemoglobin degradation products in *Plasmodium falciparum*: *Mol Biochem Parasitol*, v. 86, p. 179-86.
- Karnataki, A., A. Derocher, I. Coppens, C. Nash, J. E. Feagin, and M. Parsons, 2007a, Cell cycle-regulated vesicular trafficking of *Toxoplasma* APT1, a protein localized to multiple apicoplast membranes: *Mol Microbiol*, v. 63, p. 1653-68.
- Karnataki, A., A. E. Derocher, I. Coppens, J. E. Feagin, and M. Parsons, 2007b, A membrane protease is targeted to the relict plastid of *Toxoplasma* via an internal signal sequence: *Traffic*, v. 8, p. 1543-53.
- Karnataki, A., A. E. DeRocher, J. E. Feagin, and M. Parsons, 2009, Sequential processing of the *Toxoplasma* apicoplast membrane protein FtsH1 in topologically distinct domains during intracellular trafficking: *Mol Biochem Parasitol*, v. 166, p. 126-33.
- Keeling, P. J., 2009, Chromalveolates and the evolution of plastids by secondary endosymbiosis: *J Eukaryot Microbiol*, v. 56, p. 1-8.
- Keeling, P. J., 2010, The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 365, p. 729-48.
- Keeling, P. J., 2013, The Number, Speed, and Impact of Plastid Endosymbioses in Eukaryotic Evolution: *Annu Rev Plant Biol*.
- Keenan, R. J., D. M. Freymann, R. M. Stroud, and P. Walter, 2001, The signal recognition particle: *Annu Rev Biochem*, v. 70, p. 755-75.
- Kilejian, A., 1975, Circular mitochondrial DNA from the avian malarial parasite *Plasmodium lophurae*: *Biochim Biophys Acta*, v. 390, p. 276-84.
- Kilian, O., and P. G. Kroth, 2005, Identification and characterization of a new conserved motif within the presequence of proteins targeted into complex diatom plastids: *Plant J*, v. 41, p. 175-83.
- Kim, E., and L. E. Graham, 2008, EEF2 analysis challenges the monophyly of Archaeplastida and Chromalveolata: *PLoS One*, v. 3, p. e2621.
- Kirk, K., and K. J. Saliba, 2007, Targeting nutrient uptake mechanisms in *Plasmodium*: *Curr Drug Targets*, v. 8, p. 75-88.
- Kirk, K., H. M. Staines, R. E. Martin, and K. J. Saliba, 1999, Transport properties of the host cell membrane: *Novartis Found Symp*, v. 226, p. 55-66; discussion 66-73.
- Kirkman, L. A., and K. W. Deitsch, 2012, Antigenic variation and the generation of diversity in malaria parasites: *Curr Opin Microbiol*, v. 15, p. 456-62.
- Kitajima, A., S. Asatsuma, H. Okada, Y. Hamada, K. Kaneko, Y. Nanjo, Y. Kawagoe, K. Toyooka, K. Matsuoka, M. Takeuchi, A. Nakano, and T. Mitsui, 2009, The rice alpha-amylase glycoprotein is targeted from the Golgi apparatus through the secretory pathway to the plastids: *Plant Cell*, v. 21, p. 2844-58.
- Klemba, M., W. Beatty, I. Gluzman, and D. E. Goldberg, 2004, Trafficking of plasmepsin II to the food vacuole of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: *J Cell Biol*, v. 164, p. 47-56.
- Kolakovich, K. A., I. Y. Gluzman, K. L. Duffin, and D. E. Goldberg, 1997, Generation of hemoglobin peptides in the acidic digestive vacuole of *Plasmodium falciparum* implicates peptide transport in amino acid production: *Mol Biochem Parasitol*, v. 87, p. 123-35.

- Kreis, T. E., and R. Pepperkok, 1994, Coat proteins in intracellular membrane transport: *Curr Opin Cell Biol*, v. 6, p. 533-7.
- Kriek, N., L. Tilley, P. Horrocks, R. Pinches, B. C. Elford, D. J. Ferguson, K. Lingelbach, and C. I. Newbold, 2003, Characterization of the pathway for transport of the cytoadherence-mediating protein, PfEMP1, to the host cell surface in malaria parasite-infected erythrocytes: *Mol Microbiol*, v. 50, p. 1215-27.
- Krugliak, M., J. Zhang, and H. Ginsburg, 2002, Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* utilizes only a fraction of the amino acids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins: *Mol Biochem Parasitol*, v. 119, p. 249-56.
- Kuehn, A., and G. Pradel, 2010, The coming-out of malaria gametocytes: *J Biomed Biotechnol*, v. 2010, p. 976827.
- Kumar, B., S. Chaubey, P. Shah, A. Tanveer, M. Charan, M. I. Siddiqi, and S. Habib, 2011, Interaction between sulphur mobilisation proteins SufB and SufC: evidence for an iron-sulphur cluster biogenesis pathway in the apicoplast of *Plasmodium falciparum*: *Int J Parasitol*, v. 41, p. 991-9.
- Kumar, N., G. Koski, M. Harada, M. Aikawa, and H. Zheng, 1991, Induction and localization of *Plasmodium falciparum* stress proteins related to the heat shock protein 70 family: *Mol Biochem Parasitol*, v. 48, p. 47-58.
- Köhler, S., 2005, Multi-membrane-bound structures of Apicomplexa: I. the architecture of the *Toxoplasma gondii* apicoplast: *Parasitol Res*, v. 96, p. 258-72.
- Köhler, S., C. F. Delwiche, P. W. Denny, L. G. Tilney, P. Webster, R. J. Wilson, J. D. Palmer, and D. S. Roos, 1997, A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites: *Science*, v. 275, p. 1485-9.
- Külzer, S., S. Charnaud, T. Dagan, J. Riedel, P. Mandal, E. R. Pesce, G. L. Blatch, B. S. Crabb, P. R. Gilson, and J. M. Przyborski, 2012, *Plasmodium falciparum*-encoded exported hsp70/hsp40 chaperone/co-chaperone complexes within the host erythrocyte: *Cell Microbiol*, v. 14, p. 1784-95.
- Külzer, S., N. Gehde, and J. M. Przyborski, 2009, Return to sender: use of *Plasmodium* ER retrieval sequences to study protein transport in the infected erythrocyte and predict putative ER protein families: *Parasitol Res*, v. 104, p. 1535-41.
- Külzer, S., M. Rug, K. Brinkmann, P. Cannon, A. Cowman, K. Lingelbach, G. L. Blatch, A. G. Maier, and J. M. Przyborski, 2010, Parasite-encoded Hsp40 proteins define novel mobile structures in the cytosol of the *P. falciparum*-infected erythrocyte: *Cell Microbiol*, v. 12, p. 1398-420.
- La Greca, N., A. R. Hibbs, C. Riffkin, M. Foley, and L. Tilley, 1997, Identification of an endoplasmic reticulum-resident calcium-binding protein with multiple EF-hand motifs in asexual stages of *Plasmodium falciparum*: *Mol Biochem Parasitol*, v. 89, p. 283-93.
- Lambros, C., and J. P. Vanderberg, 1979, Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture: *J Parasitol*, v. 65, p. 418-20.
- Lanzer, M., H. Wickert, G. Krohne, L. Vincensini, and C. Braun Breton, 2006, Maurer's clefts: a novel multi-functional organelle in the cytoplasm of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: *Int J Parasitol*, v. 36, p. 23-36.
- Lauer, S. A., P. K. Rathod, N. Ghori, and K. Haldar, 1997, A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malaria parasite: *Science*, v. 276, p. 1122-5.
- Lee, M. C., P. A. Moura, E. A. Miller, and D. A. Fidock, 2008, *Plasmodium falciparum* Sec24 marks transitional ER that exports a model cargo via a diacidic motif: *Mol Microbiol*, v. 68, p. 1535-46.
- Leiby, D. A., 2011, Transfusion-transmitted *Babesia* spp.: bull's-eye on *Babesia microti*: *Clin Microbiol Rev*, v. 24, p. 14-28.
- Lemgruber, L., M. Kudryashev, C. Dekiwadia, D. T. Riglar, J. Baum, H. Stahlberg, S. A. Ralph, and F. Frischknecht, 2013, Cryo-electron tomography reveals four-membrane architecture of the *Plasmodium* apicoplast: *Malar J*, v. 12, p. 25.

- Levine, N. D., J. O. Corliss, F. E. Cox, G. Deroux, J. Grain, B. M. Honigberg, G. F. Leedale, A. R. Loeblich, J. Lom, D. Lynn, E. G. Merinfeld, F. C. Page, G. Poljansky, V. Sprague, J. Vavra, and F. G. Wallace, 1980, A newly revised classification of the protozoa: *J Protozool*, v. 27, p. 37-58.
- Lew, V. L., T. Tiffert, and H. Ginsburg, 2003, Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells: *Blood*, v. 101, p. 4189-94.
- Lewis, M. J., and H. R. Pelham, 1992, Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum: *Cell*, v. 68, p. 353-64.
- Lewis, M. J., D. J. Sweet, and H. R. Pelham, 1990, The ERD2 gene determines the specificity of the luminal ER protein retention system: *Cell*, v. 61, p. 1359-63.
- Lim, L., M. Kalanon, and G. I. McFadden, 2009, New proteins in the apicoplast membranes: time to rethink apicoplast protein targeting: *Trends Parasitol*, v. 25, p. 197-200.
- Lim, L., and G. I. McFadden, 2010, The evolution, metabolism and functions of the apicoplast: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 365, p. 749-63.
- Lingelbach, K., and K. A. Joiner, 1998, The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: an unusual compartment in infected cells: *J Cell Sci*, v. 111 (Pt 11), p. 1467-75.
- Lingelbach, K., and J. M. Przyborski, 2006, The long and winding road: protein trafficking mechanisms in the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte: *Mol Biochem Parasitol*, v. 147, p. 1-8.
- Lippincott-Schwartz, J., L. C. Yuan, J. S. Bonifacino, and R. D. Klausner, 1989, Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER: *Cell*, v. 56, p. 801-13.
- MacRae, J. I., E. Maréchal, C. Biot, and C. Y. Botté, 2012, The apicoplast: a key target to cure malaria: *Curr Pharm Des*, v. 18, p. 3490-504.
- Mahajan, B., R. Noiva, A. Yadava, H. Zheng, V. Majam, K. V. Mohan, J. K. Moch, J. D. Haynes, H. Nakhasi, and S. Kumar, 2006, Protein disulfide isomerase assisted protein folding in malaria parasites: *Int J Parasitol*, v. 36, p. 1037-48.
- Maher, S. P., B. Balu, D. A. Shoue, M. E. Weissenbach, and J. H. Adams, 2008, A highly sensitive, PCR-based method for the detection of *Plasmodium falciparum* clones in microtiter plates: *Malar J*, v. 7, p. 222.
- Maier, A. G., B. M. Cooke, A. F. Cowman, and L. Tilley, 2009, Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte: *Nat Rev Microbiol*, v. 7, p. 341-54.
- Majoul, I., K. Sohn, F. T. Wieland, R. Pepperkok, M. Pizza, J. Hillemann, and H. D. Söling, 1998, KDEL receptor (Erd2p)-mediated retrograde transport of the cholera toxin A subunit from the Golgi involves COPI, p23, and the COOH terminus of Erd2p: *J Cell Biol*, v. 143, p. 601-12.
- Margos, G., L. H. Bannister, A. R. Dlugewski, J. Hopkins, I. T. Williams, and G. H. Mitchell, 2004, Correlation of structural development and differential expression of invasion-related molecules in schizonts of *Plasmodium falciparum*: *Parasitology*, v. 129, p. 273-87.
- Margulis, L., 1971, Symbiosis and evolution: *Sci Am*, v. 225, p. 48-57.
- Markus, M. B., 2011, Malaria: origin of the term "hypnozoite": *J Hist Biol*, v. 44, p. 781-6.
- Marra, P., L. Salvatore, A. Mironov, A. Di Campi, G. Di Tullio, A. Trucco, G. Beznoussenko, and M. A. De Matteis, 2007, The biogenesis of the Golgi ribbon: the roles of membrane input from the ER and of GM130: *Mol Biol Cell*, v. 18, p. 1595-608.
- McFadden, G. I., 2000, Mergers and acquisitions: malaria and the great chloroplast heist: *Genome Biol*, v. 1, p. REVIEWS1026.
- McFadden, G. I., 2011, The apicoplast: *Protoplasma*, v. 248, p. 641-50.
- McFadden, G. I., M. E. Reith, J. Munholland, and N. Lang-Unnasch, 1996, Plastid in human parasites: *Nature*, v. 381, p. 482.
- McIntosh, M. T., D. A. Elliott, and K. A. Joiner, 2005, *Plasmodium falciparum*: discovery of peroxidase active organelles: *Exp Parasitol*, v. 111, p. 133-6.
- McMillan, P. J., C. Millet, S. Batinovic, M. Maiorca, E. Hanssen, S. Kenny, R. A. Muhle, M. Melcher, D. A. Fidock, J. D. Smith, M. W. Dixon, and L. Tilley, 2013, Spatial and temporal mapping of the PfEMP1 export pathway in *Plasmodium falciparum*: *Cell Microbiol*.

- McNew, J. A., F. Parlati, R. Fukuda, R. J. Johnston, K. Paz, F. Paumet, T. H. Söllner, and J. E. Rothman, 2000, Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins: *Nature*, v. 407, p. 153-9.
- Mehnert, M., T. Sommer, and E. Jarosch, 2010, ERAD ubiquitin ligases: multifunctional tools for protein quality control and waste disposal in the endoplasmic reticulum: *Bioessays*, v. 32, p. 905-13.
- Mercier, C., K. D. Adjogble, W. Däubener, and M. F. Delauw, 2005, Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites?: *Int J Parasitol*, v. 35, p. 829-49.
- Mereschkowski, K. S., 1905, Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche, *Biol. Centralbibl*, p. 593-604; 689-691.
- Moog, D., S. Stork, S. Zauner, and U. G. Maier, 2011, In silico and in vivo investigations of proteins of a minimized eukaryotic cytoplasm: *Genome Biol Evol*, v. 3, p. 375-82.
- Moore, R. B., M. Oborník, J. Janouskovec, T. Chrudimský, M. Vancová, D. H. Green, S. W. Wright, N. W. Davies, C. J. Bolch, K. Heimann, J. Slapeta, O. Hoegh-Guldberg, J. M. Logsdon, and D. A. Carter, 2008, A photosynthetic alveolate closely related to apicomplexan parasites: *Nature*, v. 451, p. 959-63.
- Morrison, D. A., 2009, Evolution of the Apicomplexa: where are we now?: *Trends Parasitol*, v. 25, p. 375-82.
- Mouray, E., M. Moutiez, S. Girault, C. Sergheraert, I. Florent, and P. Grellier, 2007, Biochemical properties and cellular localization of *Plasmodium falciparum* protein disulfide isomerase: *Biochimie*, v. 89, p. 337-46.
- Moustafa, A., B. Beszteri, U. G. Maier, C. Bowler, K. Valentin, and D. Bhattacharya, 2009, Genomic footprints of a cryptic plastid endosymbiosis in diatoms: *Science*, v. 324, p. 1724-6.
- Mullin, K. A., L. Lim, S. A. Ralph, T. P. Spurck, E. Handman, and G. I. McFadden, 2006, Membrane transporters in the relict plastid of malaria parasites: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, p. 9572-7.
- Muraguri, G. R., H. K. Kiara, and N. McHardy, 1999, Treatment of East Coast fever: a comparison of parvaquone and buparvaquone: *Vet Parasitol*, v. 87, p. 25-37.
- Murphy, S. C., B. U. Samuel, T. Harrison, K. D. Speicher, D. W. Speicher, M. E. Reid, R. Prohaska, P. S. Low, M. J. Tanner, N. Mohandas, and K. Haldar, 2004, Erythrocyte detergent-resistant membrane proteins: their characterization and selective uptake during malarial infection: *Blood*, v. 103, p. 1920-8.
- Müller, I. B., and J. E. Hyde, 2010, Antimalarial drugs: modes of action and mechanisms of parasite resistance: *Future Microbiol*, v. 5, p. 1857-73.
- Nagaraj, V. A., R. Arumugam, N. R. Chandra, D. Prasad, P. N. Rangarajan, and G. Padmanaban, 2009a, Localisation of *Plasmodium falciparum* uroporphyrinogen III decarboxylase of the heme-biosynthetic pathway in the apicoplast and characterisation of its catalytic properties: *Int J Parasitol*, v. 39, p. 559-68.
- Nagaraj, V. A., R. Arumugam, B. Gopalakrishnan, Y. S. Jyothsna, P. N. Rangarajan, and G. Padmanaban, 2008, Unique properties of *Plasmodium falciparum* porphobilinogen deaminase: *J Biol Chem*, v. 283, p. 437-44.
- Nagaraj, V. A., R. Arumugam, D. Prasad, P. N. Rangarajan, and G. Padmanaban, 2010a, Protoporphyrinogen IX oxidase from *Plasmodium falciparum* is anaerobic and is localized to the mitochondrion: *Mol Biochem Parasitol*, v. 174, p. 44-52.
- Nagaraj, V. A., D. Prasad, R. Arumugam, P. N. Rangarajan, and G. Padmanaban, 2010b, Characterization of coproporphyrinogen III oxidase in *Plasmodium falciparum* cytosol: *Parasitol Int*, v. 59, p. 121-7.
- Nagaraj, V. A., D. Prasad, P. N. Rangarajan, and G. Padmanaban, 2009b, Mitochondrial localization of functional ferrochelatase from *Plasmodium falciparum*: *Mol Biochem Parasitol*, v. 168, p. 109-12.
- Nassoury, N., M. Cappadocia, and D. Morse, 2003, Plastid ultrastructure defines the protein import pathway in dinoflagellates: *J Cell Sci*, v. 116, p. 2867-74.

- Nassoury, N., and D. Morse, 2005, Protein targeting to the chloroplasts of photosynthetic eukaryotes: getting there is half the fun: *Biochim Biophys Acta*, v. 1743, p. 5-19.
- Ndam, N. T., and P. Deloron, 2007, Molecular aspects of *Plasmodium falciparum* Infection during pregnancy: *J Biomed Biotechnol*, v. 2007, p. 43785.
- Nebenführ, A., C. Ritzenthaler, and D. G. Robinson, 2002, Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion: *Plant Physiol*, v. 130, p. 1102-8.
- Nevin, W. D., and J. B. Dacks, 2009, Repeated secondary loss of adaptin complex genes in the Apicomplexa: *Parasitol Int*, v. 58, p. 86-94.
- Nilsson, T., and G. Warren, 1994, Retention and retrieval in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus: *Curr Opin Cell Biol*, v. 6, p. 517-21.
- Oborník, M., J. Janouškovec, T. Chrudimský, and J. Lukes, 2009, Evolution of the apicoplast and its hosts: from heterotrophy to autotrophy and back again: *Int J Parasitol*, v. 39, p. 1-12.
- Oborník, M., D. Modrý, M. Lukeš, E. Cernotíková-Stříbrná, J. Cihlář, M. Tesařová, E. Kotabová, M. Vancová, O. Prášil, and J. Lukeš, 2012, Morphology, ultrastructure and life cycle of *Vitrella brassicaformis* n. sp., n. gen., a novel chromerid from the Great Barrier Reef: *Protist*, v. 163, p. 306-23.
- Oborník, M., M. Vancová, D. H. Lai, J. Janouškovec, P. J. Keeling, and J. Lukeš, 2011, Morphology and ultrastructure of multiple life cycle stages of the photosynthetic relative of apicomplexa, *Chromera velia*: *Protist*, v. 162, p. 115-30.
- Ockenhouse, C. F., 1993, The molecular basis for the cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to endothelium: *Semin Cell Biol*, v. 4, p. 297-303.
- Orci, L., M. Ravazzola, P. Meda, C. Holcomb, H. P. Moore, L. Hicke, and R. Schekman, 1991, Mammalian Sec23p homologue is restricted to the endoplasmic reticulum transitional cytoplasm: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 88, p. 8611-5.
- Ostermann, J., L. Orci, K. Tani, M. Amherdt, M. Ravazzola, Z. Elazar, and J. E. Rothman, 1993, Stepwise assembly of functionally active transport vesicles: *Cell*, v. 75, p. 1015-25.
- Pachlatko, E., S. Rusch, A. Müller, A. Hemphill, L. Tilley, E. Hanssen, and H. P. Beck, 2010, MAHRP2, an exported protein of *Plasmodium falciparum*, is an essential component of Maurer's cleft tethers: *Mol Microbiol*, v. 77, p. 1136-52.
- Pagola, S., P. W. Stephens, D. S. Bohle, A. D. Kosar, and S. K. Madsen, 2000, The structure of malaria pigment beta-haematin: *Nature*, v. 404, p. 307-10.
- Palis, J., and G. B. Segel, 1998, Developmental biology of erythropoiesis: *Blood Rev*, v. 12, p. 106-14.
- Pasternak, N. D., and R. Dzikowski, 2009, PfEMP1: an antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: *Int J Biochem Cell Biol*, v. 41, p. 1463-6.
- Pasvol, G., R. J. Wilson, M. E. Smalley, and J. Brown, 1978, Separation of viable schizont-infected red cells of *Plasmodium falciparum* from human blood: *Ann Trop Med Parasitol*, v. 72, p. 87-8.
- Pei, Y., A. S. Tarun, A. M. Vaughan, R. W. Herman, J. M. Soliman, A. Erickson-Wayman, and S. H. Kappe, 2010, *Plasmodium* pyruvate dehydrogenase activity is only essential for the parasite's progression from liver infection to blood infection: *Mol Microbiol*, v. 75, p. 957-71.
- Perkins, S. L., and C. C. Austin, 2009, Four new species of *Plasmodium* from New Guinea lizards: integrating morphology and molecules: *J Parasitol*, v. 95, p. 424-33.
- Peyroche, A., B. Antonny, S. Robineau, J. Acker, J. Cherfils, and C. L. Jackson, 1999, Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain: *Mol Cell*, v. 3, p. 275-85.
- Ponts, N., A. Saraf, D. W. Chung, A. Harris, J. Prudhomme, M. P. Washburn, L. Florens, and K. G. Le Roch, 2011, Unraveling the ubiquitome of the human malaria parasite: *J Biol Chem*, v. 286, p. 40320-30.
- Pouvelle, B., J. A. Gormley, and T. F. Taraschi, 1994, Characterization of trafficking pathways and membrane genesis in malaria-infected erythrocytes: *Mol Biochem Parasitol*, v. 66, p. 83-96.
- Prudêncio, M., A. Rodriguez, and M. M. Mota, 2006, The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage: *Nat Rev Microbiol*, v. 4, p. 849-56.

- Przyborski, J. M., S. K. Miller, J. M. Pfahler, P. P. Henrich, P. Rohrbach, B. S. Crabb, and M. Lanzer, 2005, Trafficking of STEVOR to the Maurer's clefts in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: *EMBO J*, v. 24, p. 2306-17.
- Quashie, N. B., L. C. Ranford-Cartwright, and H. P. de Koning, 2010, Uptake of purines in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes is mostly mediated by the human equilibrative nucleoside transporter and the human facilitative nucleobase transporter: *Malar J*, v. 9, p. 36.
- Quevillon, E., T. Spielmann, K. Brahimi, D. Chattopadhyay, E. Yeramian, and G. Langsley, 2003, The *Plasmodium falciparum* family of Rab GTPases: *Gene*, v. 306, p. 13-25.
- Radhamony, R. N., and S. M. Theg, 2006, Evidence for an ER to Golgi to chloroplast protein transport pathway: *Trends Cell Biol*, v. 16, p. 385-7.
- Ralph, S. A., B. J. Foth, N. Hall, and G. I. McFadden, 2004a, Evolutionary pressures on apicoplast transit peptides: *Mol Biol Evol*, v. 21, p. 2183-94.
- Ralph, S. A., G. G. van Dooren, R. F. Waller, M. J. Crawford, M. J. Fraunholz, B. J. Foth, C. J. Tonkin, D. S. Roos, and G. I. McFadden, 2004b, Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast: *Nat Rev Microbiol*, v. 2, p. 203-16.
- Reichel, M. P., M. Alejandra Ayanegui-Alcérreca, L. F. Gondim, and J. T. Ellis, 2013, What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question: *Int J Parasitol*, v. 43, p. 133-42.
- Ricci, F., 2012, Social implications of malaria and their relationships with poverty: *Mediterr J Hematol Infect Dis*, v. 4, p. e2012048.
- Richard, D., C. A. MacRaid, D. T. Riglar, J. A. Chan, M. Foley, J. Baum, S. A. Ralph, R. S. Norton, and A. F. Cowman, 2010, Interaction between *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and the rhoptry neck protein complex defines a key step in the erythrocyte invasion process of malaria parasites: *J Biol Chem*, v. 285, p. 14815-22.
- Robinson, M. S., and J. S. Bonifacino, 2001, Adaptor-related proteins: *Curr Opin Cell Biol*, v. 13, p. 444-53.
- Rogerson, S. J., 2010, Malaria in pregnancy and the newborn: *Adv Exp Med Biol*, v. 659, p. 139-52.
- Rosario, V., 1981, Cloning of naturally occurring mixed infections of malaria parasites: *Science*, v. 212, p. 1037-8.
- Rosenthal, P. J., and S. R. Meshnick, 1996, Hemoglobin catabolism and iron utilization by malaria parasites: *Mol Biochem Parasitol*, v. 83, p. 131-9.
- Rossner, M., and K. M. Yamada, 2004, What's in a picture? The temptation of image manipulation: *J Cell Biol*, v. 166, p. 11-5.
- Rowe, J. A., A. Claessens, R. A. Corrigan, and M. Arman, 2009, Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications: *Expert Rev Mol Med*, v. 11, p. e16.
- Röhrich, R. C., N. Englert, K. Troschke, A. Reichenberg, M. Hintz, F. Seeber, E. Balconi, A. Aliverti, G. Zanetti, U. Köhler, M. Pfeiffer, E. Beck, H. Jomaa, and J. Wiesner, 2005, Reconstitution of an apicoplast-localised electron transfer pathway involved in the isoprenoid biosynthesis of *Plasmodium falciparum*: *FEBS Lett*, v. 579, p. 6433-8.
- Saadatnia, G., and M. Golkar, 2012, A review on human toxoplasmosis: *Scand J Infect Dis*, v. 44, p. 805-14.
- Sachs, J., and P. Malaney, 2002, The economic and social burden of malaria: *Nature*, v. 415, p. 680-5.
- Sagan, L., 1967, On the origin of mitosing cells: *J Theor Biol*, v. 14, p. 255-74.
- Sato, S., B. Clough, L. Coates, and R. J. Wilson, 2004, Enzymes for heme biosynthesis are found in both the mitochondrion and plastid of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: *Protist*, v. 155, p. 117-25.
- Scales, S. J., M. Gomez, and T. E. Kreis, 2000, Coat proteins regulating membrane traffic: *Int Rev Cytol*, v. 195, p. 67-144.
- Scheel, A. A., and H. R. Pelham, 1996, Purification and characterization of the human KDEL receptor: *Biochemistry*, v. 35, p. 10203-9.
- Schmid, S. L., 1997, Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process: *Annu Rev Biochem*, v. 66, p. 511-48.

- Schnittger, L., A. E. Rodriguez, M. Florin-Christensen, and D. A. Morrison, 2012, Babesia: a world emerging: *Infect Genet Evol*, v. 12, p. 1788-809.
- Scholtyssek, E., and G. Piekarski, 1965, [Electron microscopic studies on merozoites of *Eimeria* (*Eimeria perforans* and *E. stidae*) and *Toxoplasma gondii*. On the systematic position of *T. gondii*]: *Z Parasitenkd*, v. 26, p. 91-115.
- Sciaky, N., J. Presley, C. Smith, K. J. Zaal, N. Cole, J. E. Moreira, M. Terasaki, E. Siggia, and J. Lippincott-Schwartz, 1997, Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells: *J Cell Biol*, v. 139, p. 1137-55.
- Seeber, F., 2002, Biogenesis of iron-sulphur clusters in amitochondriate and apicomplexan protists: *Int J Parasitol*, v. 32, p. 1207-17.
- Seeber, F., and D. Soldati-Favre, 2010, Metabolic pathways in the apicoplast of apicomplexa: *Int Rev Cell Mol Biol*, v. 281, p. 161-228.
- Semenza, J. C., K. G. Hardwick, N. Dean, and H. R. Pelham, 1990, ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway: *Cell*, v. 61, p. 1349-57.
- Serafini, T., L. Orci, M. Amherdt, M. Brunner, R. A. Kahn, and J. E. Rothman, 1991, ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein: *Cell*, v. 67, p. 239-53.
- Sharma, Y. D., 1991, Knobs, knob proteins and cytoadherence in falciparum malaria: *Int J Biochem*, v. 23, p. 775-89.
- Sharman, P. A., N. C. Smith, M. G. Wallach, and M. Katrib, 2010, Chasing the golden egg: vaccination against poultry coccidiosis: *Parasite Immunol*, v. 32, p. 590-8.
- Sheiner, L., J. L. Demerly, N. Poulsen, W. L. Beatty, O. Lucas, M. S. Behnke, M. W. White, and B. Striepen, 2011, A systematic screen to discover and analyze apicoplast proteins identifies a conserved and essential protein import factor: *PLoS Pathog*, v. 7, p. e1002392.
- Sheiner, L., and B. Striepen, 2013, Protein sorting in complex plastids: *Biochim Biophys Acta*, v. 1833, p. 352-9.
- Shonhai, A., A. Boshoff, and G. L. Blatch, 2007, The structural and functional diversity of Hsp70 proteins from *Plasmodium falciparum*: *Protein Sci*, v. 16, p. 1803-18.
- Sláviková, S., R. Vacula, Z. Fang, T. Ehara, T. Osafune, and S. D. Schwartzbach, 2005, Homologous and heterologous reconstitution of Golgi to chloroplast transport and protein import into the complex chloroplasts of *Euglena*: *J Cell Sci*, v. 118, p. 1651-61.
- Smith, M. H., H. L. Ploegh, and J. S. Weissman, 2011, Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum: *Science*, v. 334, p. 1086-90.
- Soll, J., and E. Schleiff, 2004, Protein import into chloroplasts: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 5, p. 198-208.
- Sommer, M. S., S. B. Gould, P. Lehmann, A. Gruber, J. M. Przyborski, and U. G. Maier, 2007, Der1-mediated preprotein import into the periplastid compartment of chromalveolates?: *Mol Biol Evol*, v. 24, p. 918-28.
- Spork, S., J. A. Hiss, K. Mandel, M. Sommer, T. W. Kooij, T. Chu, G. Schneider, U. G. Maier, and J. M. Przyborski, 2009, An unusual ERAD-like complex is targeted to the apicoplast of *Plasmodium falciparum*: *Eukaryot Cell*, v. 8, p. 1134-45.
- Staines, H. M., J. C. Ellory, and K. Chibale, 2005, The new permeability pathways: targets and selective routes for the development of new antimalarial agents: *Comb Chem High Throughput Screen*, v. 8, p. 81-8.
- Stork, S., D. Moog, J. M. Przyborski, I. Wilhelmi, S. Zauner, and U. G. Maier, 2012, Distribution of the SELMA translocon in secondary plastids of red algal origin and predicted uncoupling of ubiquitin-dependent translocation from degradation: *Eukaryot Cell*, v. 11, p. 1472-81.
- Strittmatter, P., J. Soll, and B. Bölter, 2010, The chloroplast protein import machinery: a review: *Methods Mol Biol*, v. 619, p. 307-21.
- Struck, N. S., S. de Souza Dias, C. Langer, M. Marti, J. A. Pearce, A. F. Cowman, and T. W. Gilberger, 2005, Re-defining the Golgi complex in *Plasmodium falciparum* using the novel Golgi marker PfGRASP: *J Cell Sci*, v. 118, p. 5603-13.

- Struck, N. S., S. Herrmann, C. Langer, A. Krueger, B. J. Foth, K. Engelberg, A. L. Cabrera, S. Haase, M. Treeck, M. Marti, A. F. Cowman, T. Spielmann, and T. W. Gilberger, 2008a, Plasmodium falciparum possesses two GRASP proteins that are differentially targeted to the Golgi complex via a higher- and lower-eukaryote-like mechanism: *J Cell Sci*, v. 121, p. 2123-9.
- Struck, N. S., S. Herrmann, I. Schmuck-Barkmann, S. de Souza Dias, S. Haase, A. L. Cabrera, M. Treeck, C. Bruns, C. Langer, A. F. Cowman, M. Marti, T. Spielmann, and T. W. Gilberger, 2008b, Spatial dissection of the cis- and trans-Golgi compartments in the malaria parasite Plasmodium falciparum: *Mol Microbiol*, v. 67, p. 1320-30.
- Sturm, A., R. Amino, C. van de Sand, T. Regen, S. Retzlaff, A. Rennenberg, A. Krueger, J. M. Pollok, R. Menard, and V. T. Heussler, 2006, Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids: *Science*, v. 313, p. 1287-90.
- Sulli, C., Z. Fang, U. Muchhal, and S. D. Schwartzbach, 1999, Topology of Euglena chloroplast protein precursors within endoplasmic reticulum to Golgi to chloroplast transport vesicles: *J Biol Chem*, v. 274, p. 457-63.
- Sullivan, D. J., I. Y. Gluzman, and D. E. Goldberg, 1996, Plasmodium hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins: *Science*, v. 271, p. 219-22.
- Suplick, K., R. Akella, A. Saul, and A. B. Vaidya, 1988, Molecular cloning and partial sequence of a 5.8 kilobase pair repetitive DNA from Plasmodium falciparum: *Mol Biochem Parasitol*, v. 30, p. 289-90.
- Surolia, N., and A. Surolia, 2001, Triclosan offers protection against blood stages of malaria by inhibiting enoyl-ACP reductase of Plasmodium falciparum: *Nat Med*, v. 7, p. 167-73.
- Tawk, L., J. F. Dubremetz, P. Montcourrier, G. Chicanne, F. Merezegue, V. Richard, B. Payrastre, M. Meissner, H. J. Vial, C. Roy, K. Wengelnik, and M. Lebrun, 2011, Phosphatidylinositol 3-monophosphate is involved in toxoplasma apicoplast biogenesis: *PLoS Pathog*, v. 7, p. e1001286.
- Taylor, D. W., M. Parra, G. B. Chapman, M. E. Stearns, J. Rener, M. Aikawa, S. Uni, S. B. Aley, L. J. Panton, and R. J. Howard, 1987, Localization of Plasmodium falciparum histidine-rich protein 1 in the erythrocyte skeleton under knobs: *Mol Biochem Parasitol*, v. 25, p. 165-74.
- Tilley, L., R. Sougrat, T. Lithgow, and E. Hanssen, 2008, The twists and turns of Maurer's cleft trafficking in P. falciparum-infected erythrocytes: *Traffic*, v. 9, p. 187-97.
- Tomova, C., W. J. Geerts, T. Müller-Reichert, R. Entzeroth, and B. M. Humbel, 2006, New comprehension of the apicoplast of Sarcocystis by transmission electron tomography: *Biol Cell*, v. 98, p. 535-45.
- Tomova, C., B. M. Humbel, W. J. Geerts, R. Entzeroth, J. C. Holthuis, and A. J. Verkleij, 2009, Membrane contact sites between apicoplast and ER in Toxoplasma gondii revealed by electron tomography: *Traffic*, v. 10, p. 1471-80.
- Tonkin, C. J., B. J. Foth, S. A. Ralph, N. Struck, A. F. Cowman, and G. I. McFadden, 2008a, Evolution of malaria parasite plastid targeting sequences: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 105, p. 4781-5.
- Tonkin, C. J., M. Kalanon, and G. I. McFadden, 2008b, Protein targeting to the malaria parasite plastid: *Traffic*, v. 9, p. 166-75.
- Tonkin, C. J., J. A. Pearce, G. I. McFadden, and A. F. Cowman, 2006a, Protein targeting to destinations of the secretory pathway in the malaria parasite Plasmodium falciparum: *Curr Opin Microbiol*, v. 9, p. 381-7.
- Tonkin, C. J., N. S. Struck, K. A. Mullin, L. M. Stimmler, and G. I. McFadden, 2006b, Evidence for Golgi-independent transport from the early secretory pathway to the plastid in malaria parasites: *Mol Microbiol*, v. 61, p. 614-30.
- Tonkin, C. J., G. G. van Dooren, T. P. Spurck, N. S. Struck, R. T. Good, E. Handman, A. F. Cowman, and G. I. McFadden, 2004, Localization of organellar proteins in Plasmodium falciparum using a novel set of transfection vectors and a new immunofluorescence fixation method: *Mol Biochem Parasitol*, v. 137, p. 13-21.
- Toso, M. A., and C. K. Omoto, 2007, Gregarina niphandrodes may lack both a plastid genome and organelle: *J Eukaryot Microbiol*, v. 54, p. 66-72.

- Trager, W., M. A. Rudzinska, and P. C. Bradbury, 1966, The fine structure of *Plasmodium falciparum* and its host erythrocytes in natural malarial infections in man: *Bull World Health Organ*, v. 35, p. 883-5.
- Trelka, D. P., T. G. Schneider, J. C. Reeder, and T. F. Taraschi, 2000, Evidence for vesicle-mediated trafficking of parasite proteins to the host cell cytosol and erythrocyte surface membrane in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes: *Mol Biochem Parasitol*, v. 106, p. 131-45.
- Tuteja, R., A. Pradhan, and S. Sharma, 2008, *Plasmodium falciparum* signal peptidase is regulated by phosphorylation and required for intra-erythrocytic growth: *Mol Biochem Parasitol*, v. 157, p. 137-47.
- Vacula, R., S. Sláviková, and S. D. Schwartzbach, 2007, Protein trafficking to the complex chloroplasts of *Euglena*: *Methods Mol Biol*, v. 390, p. 219-37.
- Vaidya, A. B., R. Akella, and K. Suplick, 1989, Sequences similar to genes for two mitochondrial proteins and portions of ribosomal RNA in tandemly arrayed 6-kilobase-pair DNA of a malarial parasite: *Mol Biochem Parasitol*, v. 35, p. 97-107.
- Vaidya, A. B., and M. W. Mather, 2009, Mitochondrial evolution and functions in malaria parasites: *Annu Rev Microbiol*, v. 63, p. 249-67.
- van Dooren, G. G., M. Marti, C. J. Tonkin, L. M. Stimmler, A. F. Cowman, and G. I. McFadden, 2005, Development of the endoplasmic reticulum, mitochondrion and apicoplast during the asexual life cycle of *Plasmodium falciparum*: *Mol Microbiol*, v. 57, p. 405-19.
- van Dooren, G. G., S. B. Reiff, C. Tomova, M. Meissner, B. M. Humbel, and B. Striepen, 2009, A novel dynamin-related protein has been recruited for apicoplast fission in *Toxoplasma gondii*: *Curr Biol*, v. 19, p. 267-76.
- van Dooren, G. G., S. D. Schwartzbach, T. Osafune, and G. I. McFadden, 2001, Translocation of proteins across the multiple membranes of complex plastids: *Biochim Biophys Acta*, v. 1541, p. 34-53.
- van Dooren, G. G., L. M. Stimmler, and G. I. McFadden, 2006, Metabolic maps and functions of the *Plasmodium* mitochondrion: *FEMS Microbiol Rev*, v. 30, p. 596-630.
- van Dooren, G. G., V. Su, M. C. D'Ombra, and G. I. McFadden, 2002, Processing of an apicoplast leader sequence in *Plasmodium falciparum* and the identification of a putative leader cleavage enzyme: *J Biol Chem*, v. 277, p. 23612-9.
- van Dooren, G. G., C. Tomova, S. Agrawal, B. M. Humbel, and B. Striepen, 2008, *Toxoplasma gondii* Tic20 is essential for apicoplast protein import: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 105, p. 13574-9.
- Van Wye, J., N. Ghori, P. Webster, R. R. Mitschler, H. G. Elmendorf, and K. Haldar, 1996, Identification and localization of rab6, separation of rab6 from ERD2 and implications for an 'unstacked' Golgi, in *Plasmodium falciparum*: *Mol Biochem Parasitol*, v. 83, p. 107-20.
- Varadharajan, S., S. Dhanasekaran, Z. Q. Bonday, P. N. Rangarajan, and G. Padmanaban, 2002, Involvement of delta-aminolaevulinate synthase encoded by the parasite gene in de novo haem synthesis by *Plasmodium falciparum*: *Biochem J*, v. 367, p. 321-7.
- Vaughan, A. M., M. T. O'Neill, A. S. Tarun, N. Camargo, T. M. Phuong, A. S. Aly, A. F. Cowman, and S. H. Kappe, 2009, Type II fatty acid synthesis is essential only for malaria parasite late liver stage development: *Cell Microbiol*, v. 11, p. 506-20.
- Villarejo, A., S. Burén, S. Larsson, A. Déjardin, M. Monné, C. Rudhe, J. Karlsson, S. Jansson, P. Lerouge, N. Rolland, G. von Heijne, M. Grebe, L. Bako, and G. Samuelsson, 2005, Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast: *Nat Cell Biol*, v. 7, p. 1224-31.
- Vlachou, D., T. Schlegelmilch, E. Runn, A. Mendes, and F. C. Kafatos, 2006, The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes: *Curr Opin Genet Dev*, v. 16, p. 384-91.
- von Heijne, G., 1985, Signal sequences. The limits of variation: *J Mol Biol*, v. 184, p. 99-105.
- Waller, R. F., P. J. Keeling, R. G. Donald, B. Striepen, E. Handman, N. Lang-Unnasch, A. F. Cowman, G. S. Besra, D. S. Roos, and G. I. McFadden, 1998, Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, p. 12352-7.
- Waller, R. F., P. J. Keeling, G. G. van Dooren, and G. I. McFadden, 2003, Comment on "A green algal apicoplast ancestor": *Science*, v. 301, p. 49; author reply 49.

- Waller, R. F., and G. I. McFadden, 2005, The apicoplast: a review of the derived plastid of apicomplexan parasites: *Curr Issues Mol Biol*, v. 7, p. 57-79.
- Waller, R. F., M. B. Reed, A. F. Cowman, and G. I. McFadden, 2000, Protein trafficking to the plastid of *Plasmodium falciparum* is via the secretory pathway: *EMBO J*, v. 19, p. 1794-802.
- Walliker, D., I. A. Quakyi, T. E. Wellems, T. F. McCutchan, A. Szarfman, W. T. London, L. M. Corcoran, T. R. Burkot, and R. Carter, 1987, Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: *Science*, v. 236, p. 1661-6.
- Ward, G. E., L. H. Miller, and J. A. Dvorak, 1993, The origin of parasitophorous vacuole membrane lipids in malaria-infected erythrocytes: *J Cell Sci*, v. 106 (Pt 1), p. 237-48.
- Ward, G. E., L. G. Tilney, and G. Langsley, 1997, Rab GTPases and the unusual secretory pathway of plasmodium: *Parasitol Today*, v. 13, p. 57-62.
- Wastl, J., and U. G. Maier, 2000, Transport of proteins into cryptomonads complex plastids: *J Biol Chem*, v. 275, p. 23194-8.
- Wellems, T. E., and C. V. Plowe, 2001, Chloroquine-resistant malaria: *J Infect Dis*, v. 184, p. 770-6.
- Wells, T. N., P. L. Alonso, and W. E. Gutteridge, 2009, New medicines to improve control and contribute to the eradication of malaria: *Nat Rev Drug Discov*, v. 8, p. 879-91.
- Wickham, M. E., M. Rug, S. A. Ralph, N. Klonis, G. I. McFadden, L. Tilley, and A. F. Cowman, 2001, Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes: *EMBO J*, v. 20, p. 5636-49.
- Wiek, S., A. F. Cowman, and K. Lingelbach, 2004, Double cross-over gene replacement within the sec 7 domain of a GDP-GTP exchange factor from *Plasmodium falciparum* allows the generation of a transgenic brefeldin A-resistant parasite line: *Mol Biochem Parasitol*, v. 138, p. 51-5.
- Williamson, D. H., M. J. Gardner, P. Preiser, D. J. Moore, K. Rangachari, and R. J. Wilson, 1994, The evolutionary origin of the 35 kb circular DNA of *Plasmodium falciparum*: new evidence supports a possible rhodophyte ancestry: *Mol Gen Genet*, v. 243, p. 249-52.
- Williamson, D. H., R. J. Wilson, P. A. Bates, S. McCready, F. Perler, and B. U. Qiang, 1985, Nuclear and mitochondrial DNA of the primate malarial parasite *Plasmodium knowlesi*: *Mol Biochem Parasitol*, v. 14, p. 199-209.
- Wilson, C., R. Venditti, L. R. Rega, A. Colanzi, G. D'Angelo, and M. A. De Matteis, 2011, The Golgi apparatus: an organelle with multiple complex functions: *Biochem J*, v. 433, p. 1-9.
- Wilson, D. W., M. J. Lewis, and H. R. Pelham, 1993, pH-dependent binding of KDEL to its receptor in vitro: *J Biol Chem*, v. 268, p. 7465-8.
- Wilson, I., 1993, Plastids better red than dead: *Nature*, v. 366, p. 638.
- Wilson, R. J., P. W. Denny, P. R. Preiser, K. Rangachari, K. Roberts, A. Roy, A. Whyte, M. Strath, D. J. Moore, P. W. Moore, and D. H. Williamson, 1996, Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: *J Mol Biol*, v. 261, p. 155-72.
- Winterberg, M., E. Rajendran, S. Baumeister, S. Bietz, K. Kirk, and K. Lingelbach, 2012, Chemical activation of a high-affinity glutamate transporter in human erythrocytes and its implications for malaria-parasite-induced glutamate uptake: *Blood*, v. 119, p. 3604-12.
- Wirth, C. C., and G. Pradel, 2012, Molecular mechanisms of host cell egress by malaria parasites: *Int J Med Microbiol*, v. 302, p. 172-8.
- Woehle, C., T. Dagan, W. F. Martin, and S. B. Gould, 2011, Red and problematic green phylogenetic signals among thousands of nuclear genes from the photosynthetic and apicomplexa-related *Chromera velia*: *Genome Biol Evol*, v. 3, p. 1220-30.
- World Health Organization., 2011, World malaria report 2011: Geneva, World Health Organization, xii, 246 p. p.
- Xu, P., G. Widmer, Y. Wang, L. S. Ozaki, J. M. Alves, M. G. Serrano, D. Puiu, P. Manque, D. Akiyoshi, A. J. Mackey, W. R. Pearson, P. H. Dear, A. T. Bankier, D. L. Peterson, M. S. Abrahamsen, V. Kapur, S. Tzipori, and G. A. Buck, 2004, The genome of *Cryptosporidium hominis*: *Nature*, v. 431, p. 1107-12.
- Yeh, E., and J. L. DeRisi, 2011, Chemical rescue of malaria parasites lacking an apicoplast defines organelle function in blood-stage *Plasmodium falciparum*: *PLoS Biol*, v. 9, p. e1001138.

- Yu, M., T. R. Kumar, L. J. Nkrumah, A. Coppi, S. Retzlaff, C. D. Li, B. J. Kelly, P. A. Moura, V. Lakshmanan, J. S. Freundlich, J. C. Valderramos, C. Vilcheze, M. Siedner, J. H. Tsai, B. Falkard, A. B. Sidhu, L. A. Purcell, P. Gratraud, L. Kremer, A. P. Waters, G. Schiehser, D. P. Jacobus, C. J. Janse, A. Ager, W. R. Jacobs, J. C. Sacchettini, V. Heussler, P. Sinnis, and D. A. Fidock, 2008, The fatty acid biosynthesis enzyme FabI plays a key role in the development of liver-stage malarial parasites: *Cell Host Microbe*, v. 4, p. 567-78.
- Zhu, G., M. J. Marchewka, and J. S. Keithly, 2000, *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome: *Microbiology*, v. 146 (Pt 2), p. 315-21.
- Zuegge, J., S. Ralph, M. Schmuker, G. I. McFadden, and G. Schneider, 2001, Deciphering apicoplast targeting signals--feature extraction from nuclear-encoded precursors of *Plasmodium falciparum* apicoplast proteins: *Gene*, v. 280, p. 19-26.

V Anhang

Anhang 1: Sequenzierung der Sec7 Domäne des BFA-resistenten *P. falciparum* Klons 7C.

Ein einzelner Klon (7C) der BFA-resistenten *P. falciparum* Zelllinie von Baumgartner und Kollegen (Baumgartner et al., 2001) wurde mittels *Limiting Dilution* isoliert und propagiert. Auf der extrahierten DNA wurde eine Sec_7-spezifische PCR mit den Primern Sec7_1 und Sec7_4 [(Baumgartner et al., 2001), siehe 2.3] durchgeführt. Die so amplifizierten Fragmente wurden in den pCR™II-Blunt-TOPO® Vektor (Invitrogen) kloniert und über Vektor-spezifische M13-Primer (siehe 2.3) sequenziert (GATC, Konstanz). Die Sequenzdaten wurden über ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) mit den Sequenzdaten von PF3D7_1442900 (PlasmoDB) verglichen. Die vorhergesagte Sec7 Domäne ist in grau hinterlegt; in gelb hinterlegt ist die Resistenz-vermittelnde Methionin zu Isoleucin Substitution aufgrund einer G -> A Punktmutation (rot). Sec7-Primersequenzen in braun.

>PF3D7_1442900

(guanine nucleotide exchange factor, putative)

```
ATGGAATACAAATATTATGATAAGAAGATGGATAAGTGCATAAGTTTTAATGAAGCTTAT
GATTTAAATAATGATGAGAAGAAGGTTGGCACAAGTTATGAAGATTTCTTATGAATAGT
TCATCATGTATGAATGATGAATATATGAAGTTAAATATTTTTACTGTTATAAAAAATGAA
ATAATAAATGTATTGTCAGTTATAAAAAAGCATGAATATAACAAAAATTTAGATTCTAGT
ATTGTAGACGCTTTATTTATATTATATAATAATAATAAATAATTTAAATAACAATTTAAAG
GAAGAAATAGATATACATGATTATAATAATAAGTTAGATATATATCACATTGCTCCCTTT
TTAAATATCATAAGAAATAATAATATCTTTTATAAAATTAAGTTAATTGCATTACATTGCG
TTAGATCATATATTAAATATAATAGTAGTTATTTTAATGATAAATGTACTAATGAACAT
ATAAATCGAAAACAAATATCTTATTTATGTGATGATTATGATCATGATCATGATCATGAT
GTCAAAAGTAATATTAGTGATAATTTATGTAAAAGAGATATTATAAATGAATCCATAGAA
AAACATTGGACCAAAGAATTTGATAACAAACATGATGGAGTTTCAACAAAAATGTTAAAT
GAAAAAGTTTCGAAAAAAAAAAAAAATATCATTTCTTTTCAAAGAATTATAAATTACATAAA
AAGTATCATATGGAAAAAGAAGAAGCAGAAGAAAATTTTACCTTTCTAATAAACAAAGGA
AATAATATTATTAATATTAGTATAGAAACATTATTGAATGCACCAATAAATTACAATAAT
ATGAATTATGAAGAAATTATTTTATATGATACTATGATATTATTTAATAATATATTAATG
AATTCCATAAAAGTTGTAGACAAAAATAATATTATAAAAAATAATATGTTATATTTTAAA
ATATACAAAAATACGAAATATTCTTTATTATTTAAAGGAAATTGTGAATCCATATTAATT
AATATTTTTCATGTGGTTATGAAAAGTTATGTAAATAATATAGACGATGATTTTATTCAT
GATATATTAACCATCATCTTAATATTAATAAATAATAATAAAAAATAAATTTGTATTAGAT
TTATTAAATAAGAAGGACTATATTAATTTATATAATGAATTATTTGAAAATGAAATGTCT
CATGAAAATTTAGAAAATATTAATATATTATCCTTTAGTTTATTAAATATATTAATGGAA
ATATATGGATATTCATTAATAAATAAAAAATTTTGATTCTATATCAAACATAATAAGATGT
TTATTTATACATATAACCTCATCATCTTATGTACTTATATGCAAAGCCTTAAGATCATAT
ATAAATATTTTCATTTTATATAAAAAGCATTTTTTTTATATATAATGAAATTTTTATTAAT
ATATTATTAATACATTAAAAAAAGGTTTCATCCAAAAACATAACTGAAACGGCATTATTA
ACCTTGTCACATTTTTGTTTAGAAAATGTGTTATTCGAAATATATTATAATTATGATGTT
AATCTATATGCTTCAGATTTATTACAGAATTTTATACAATCCATATTAGAATTGTGTGTT
AATTTTGTAAATAACGGCCATAATAAATGAGGTTATATTTAAATGATAAAAAATATT
TTGTATATATTAGTACCTTATGCTCATCACACCAAGCAGAAAAAATAGTGATCATAAAT
TGTCATAGTCATCATAATTATCATAGTCATCATAAATTATCATTGTGCATCATATAATTATCAT
TGTCATCATAAATTATCATAATCATCATAAATTATCATTGTGCATCATAAATTATCATAATCAT
CATAATGAGCATAATAATCATAATGAGCATAATCATAATAATGAGCATAGTCATCATAAT
GAGCATAATCATCATAATGAGCATAATCATCACAATCACCATAATCATCACAATCACCAT
AATCATCATAATCATCATAATCATCATAATCACCATAATCATCATAATCACCATAATCAT
CATAATCATCATAATCACCATAATCACCATAATCATCATAATGAGCATAATCATTTGAAT
AGTATACATTTACATAGTAATCATAGCTATTATAATCATAATTCTATTAATGAGATGAAT
CACATTAACCATGATATTGGTTATATAAACCAATTAATAATTGAATTTAAAAATGATATA
TATTCTGATACTTATAATAAAGTTTTTGTATCAAGGAAAAGAAAAGGGGAAGAAAAAGA
ATGTCGATACTTCATGAATTTAATATTAAGAAAGGGATAAAGAAGATGGACACGATAAC
GAAAATAAAGATGAGGACAAAAATAAGAAACATAGTAATAGTAATAACAATAATAATGAT
GGTAATGATTATGATAATGATGGAAGTTTACATCAACATAATACTGATAATCGTAGACGA
ACAAGTTTTTGCAAAGAGAAGCTATTAATGAATTGATTGACCGTTATAATGATAATAAG
AATGAATTGAAAAAAAAAACATTATCTTAATGAATTATATTCCTTAAATTTCTTATCA
TCATCAACTAAGGATAATAGATTTGTTACTTTTTGTGCACTCTTATTATTTGAACATTTT
AGAGAATATGTTAAAGTAAATATATTAAAAAAAGAAACATATAATGAGAAAGAAAAAA
AGAAGAAAGGAAATATTAAAAAAATCAGCAACTATATTTAATACACTTAAGGGTAAATCT
ATTGATGAATTAATTAATAATGAGAATTATACAAACACAAGAAACATATAATAATATCGAT
ACAAATAATGCTATCATCGATTGAGAAGCTATGCACAAAGATGATGATATAATTGAATAC
```

```
TCAAGTTCATTATATGAAAATAGATCATTCTTACTAGTGAAAATGCTGCTGAAAGGGGT
TCGAGTATTAAGAGTAATTCTTATAATCCTGATACGCATGATAATAAAATGCAAATGAAT
AATAGTAACATAGATATGAACTTGTCAAATATTAGTTATAATCATGATGAACTTGAAAA
AATAAAAGCTTAATCAATATCCATAGTAATTTTACTACGGAAGAGTCATGTGACGACATG
AATGAAAATGAAAAGGACATAAAAAAAAAAGAAGAACATACAAAAGGACATACCTCTAAA
AAAGAAGGAAAATTCCGTAAAATGGACGAAGACGAAATAGATGTAGAACAAGAAAAATAAT
AATGATAATTGTAATGATGTAGATGTAATGAAACAGGAAAAATAAAATGTTAAATGGTATT
GTTGATGAAAAAATATCAGCAAATGATCAAAAAAAAAATAATAAAATAGTTCTAATATA
CATAAAAATATATCTGATGATCATTTCAGTCTTAAATAATAAAGTAACTCCAAAAATCTGTTGCT
CATTATGAGAGAAATGATGAAGGCAAAAAAATAGACAAAAAAGATAATACTGAAAAATAAT
ATTATTAATAATATTGATGATGATAATATTCACAACAACACACAAATGAAGAAATATCT
AAAAAGGAGAGTGATTTACATAAAATAGATAATCATCATAAAAAAAAAAAGCATCATCAT
CATATGAAAGCAAGTGAAATTATTTTCATCCGTTGCTCATAATTTTTTCGAAAAAGCATT
-----GCATTTT
-----*****
PF3D7_1442900 AAACATAGTACTAAAAATAATTTAATGGAAGATGAATATTTTGTAAAATCAATGGCTAAA
7C_Sec7 AAACATAGTACTAAAAATAATTTAATGGAAGATGAATATTTTGTAAAATCAATGGCTAAA
*****
PF3D7_1442900 TTTGTAAGATATAATCCATTTTGTAGATAAAGAATTTGTAGGTGAATATATTTTACATAGG
7C_Sec7 TTTGTAAGATATAATCCATTTTGTAGATAAAGAATTTGTAGGTGAATATATTTTACATAGG
*****
PF3D7_1442900 AAAAATGTAAACCTATTAACCGTTATGTAAGATTGTTTGATTTTGTAAATTTATCGTTA
7C_Sec7 AAAAATGTAAACCTATTAACCGTTATGTAAGATTGTTTGATTTTGTAAATTTATCGTTA
*****
PF3D7_1442900 TTATCATCTTTAAGATTATTTTACGTTGTTTTAAATTACCTGGGGAAGCTCAATTAATA
7C_Sec7 TTATCATCTTTAAGATTATTTTACGTTGTTTTAAATTACCTGGGGAAGCTCAATTAATA
*****
PF3D7_1442900 GAGAGAATATTAGAACACTTTAGTTTATGTTTCTTTTATTCTAATCCAATACATGGTGTAT
7C_Sec7 GAGAGAATATTAGAACACTTTAGTTTATGTTTCTTTTATTCTAATCCAATACATGGTGTAT
*****
PF3D7_1442900 TTAAGTAACATATATAAAGTAGAAAATGATAAGGTGGTTTGTGTTGGTAAATGACGAAGAA
7C_Sec7 TTAAGTAACATATATAAAGTAGAAAATGATAAGGTGGTTTGTGTTGGTAAATGACGAAGAA
*****
PF3D7_1442900 CTAGCTAATAAAAAGAGGTACATATTAATAGATTTTTTAAATGAAAATAGTAATAAAAAAT
7C_Sec7 CTAGCTAATAAAAAGAGGTACATATTAATAGATTTTTTAAATGAAAATAGTAATAAAAAAT
*****
PF3D7_1442900 AATGTAACGCATGATGATAGTGTATTACCAAATGGTAATGAAACCGGACGCGAAAAAAAT
7C_Sec7 AATGTAACGCATGATGATAGTGTATTACCAAATGGTAATGAAACCGGACGCGAAAAAAAT
*****
PF3D7_1442900 GTGGATGAGAATAATAATGAAAATGATTCTAATTTAAATGAAAATAGTACAAATCTGAAA
7C_Sec7 GTGGATGAGAATAATAATGAAAATGATTCTAATTTAAATGAAAATAGTACAAATCTGAAA
*****
PF3D7_1442900 AAAAATAATGTAGATAATAATAAAGATAATGTGAATGATTTACATATTGAAGAAAAAAT
7C_Sec7 AAAAATAATGTAGATAATAATAAAGATAATGTGAATGATTTACATATTGAAGAAAAAAT
*****
PF3D7_1442900 AATTTAAAAAAGAATGTAGATATTAATGATTATATGCATAAAAAATGTATATTACTTATCA
7C_Sec7 AATTTAAAAAAGAATGTAGATATTAATGATTATATGCATAAAAAATGTATATTACTTATCA
*****
PF3D7_1442900 AAAAAAATTGAAAGTATGAGTGAAGAGGAAATTCAAAAGAAGTATGTACTTGTTGAAAAAT
7C_Sec7 AAAAAAATTGAAAGTATGAGTGAAGAGGAAATTCAAAAGAAGTATGTACTTGTTGAAAAAT
*****
PF3D7_1442900 AGTGATGTTATTTTTATATTGACATATTCTATAATCATGTTGAATACAGATTTACATAAT
7C_Sec7 AGTGATGTTATTTTTATATTGACATATTCTATAATCATATAATTGAATACAGATTTACATAAT
*****
PF3D7_1442900 AATCAAGTTAAGAATAAAATGAAATTAGAAGAATTTATTAATAAATAATAGAGGAATAAAT
7C_Sec7 AATCAAGTTAAGAATAAAATGAAATTAGAAGAATTTATTAATAAATAATAGAGGAATAAAT
*****
PF3D7_1442900 AATGGAATAAATATTGATAGAATATATTTAGAAAATCTATATAATTGTATTTTAAATGAA
7C_Sec7 AATGGAATAAATATTGATAGAATATATTTAGAAAATCTATATAATTGTATTTTAAATGAA
*****
PF3D7_1442900 GAAATCAAATTATTTTCAAATACACAAAACACATATACAAATGACGATCAGTATTGAAA
7C_Sec7 GAAATC
*****-----
```

TTATTAGATCAAAAAAAGAAGAATATAAATATTATCATTATTTTAAAGCTAATGAAATA
TATTTTTATAGATATGATATAAACAAATTGTTAATAAGAAATAATTTCTACCTATATTT
TTTGAACCTCTTTAAACGAACGAATGATTACAATTTAATCGAAAACGTACATTTATGTTT
AAAATGGTTATAAATAATTTGGCATATTATCATGATTTAGGAAATATAAATAAAATATGT
TATATATTTAAATATATAAATTTTTATTTAACACAAAAATGTCAATCTTTATTATATTTA
TTTTTCCATTTTCATAAAAAAATGTTATAATTCGTTTCGAAACTGTTGGTCTATTTATATT
AATATTATATTTAAATTAGTTACTATTGATTTATTGCCTATCTTTTTTTATCCACATATA
TTTATAAACAACTACTCAGTTTAAACATTGATAAAGATGTTTTAAATAGAAAGTCTAAGAAA
GGAATACCCCTAGAGACATATAATATAAATAAAAGTATTACAGAGACATATCAACATCCG
TTTTTAGTTTTTAAAGAAAAATGTCAAGAAATTAATAAATCTAAATGGATTGATGATTTT
AGTAGTATGTTTTTCTCAAGACATCATACTACGAAAAATAACAATTTGTCTATAATATTT
AAAGATAATGGTAATTATAATGAAAAGATCGAAGACATAAAAAATCAAACAAAAAGAAAAG
GAAAAGGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGTATAAGGATGATAAAGATAAGGAACATGAA
AATGAACATGATAATTTAAAGAATGATAAGAAGAAAAATAATGAAAATTTAAACATGAA
GATAGAGAAAATGAAAACCATTCAGACGGACATAATGCAGAACGTAATGATATAGATGAA
GAAGATTCTGATGAAGATGATGATGATGACGACGACGATGATGTTGATGAAGACGATAAT
GATTATGATGACGATTTTGATGATGATGATTATATTGATTATGATTGTCATAATGAAAAT
TATCATTATGATAATATCATCAACAATATTAATAATGATAACAATGATGAATTGGAATAT
ATTTATGTAAATATCAAAGTGGATCCTAAAAATATAGATAATAGTGCAATAATTGATAAT
GTTAATATATATAAAAAATTAATAATTAGATATATATAACTTTTTTACATTTAATGATTTT
CATAATAACATGATTACAAATTTAAATATTAGTAGTTTAATTTATTTAATAAAAAATTTTA
ATTATTAATGTTCAATTAaaaaAGAAAATGAAATACATAATGTATCTGCTCATCATACC
AATAAGTCCGATGTACATCATCATTCATTTTTTAAATCACACACTCTGTCTCATCATCAT
AATAATAATTATTTAACTAATGAGAAATCAGGTAACACATTTAATGTTAATGATTATATT
AATGATACAAATCCGATCATAGTGAATTCGAAAGTTCCTTTTGATCAATTTTATCATAGC
AAAGAGAAATTGCTAAGTACTCAAATGTTTTTCCATATTATGTGTTATAAGATAAATTAT
ACCTATATTTTATATAATATATTATGTAATTTGAAGTTGAAATCTTATAGAACAAAGAAAT
AGATTTATAGATAAAGGAGAAGGCCATGAAGTGAATTTATATATGAAACAAATTCATGAA
GCAAGAAAATGTAAAAATATAATCCAAGAGGAAAGAAATAAGAAAAATTTATTTGACCTA
ACCTTAAATAATATATATGACACTGATAATACAAGTGATGCTGGATTGAGCGATTCTGAT
TATAGTGACATATCTAATGATTCTTTTTTTGTGAGAAGAAAGGAACGTATATTGGTTGAT
ATATATATGCATAGTCATGAAGCTCGTGGAGAAAAACATAGGGATGAAAGAAATAGAAAT
AGTCATCATGATGATGATAATAATCATCATAATCATCATCATCATCATGATGATAATTTT
GATAATCATAAATATGTTGATGAAGATGACCTTTATGACAGTTATTATAATCATCATGAA
AATAAACATAAAAGATTACAAGAAGAACAAAATGAAGAATGTGATGAATATAAAGAAATG
TATAATGAATTTGATAAAATTTATTCGTATGCTGACAGTACAGATGACGAAAGAGAAGAT
GGACATGATGAAGATCATTCCTATGAACATGCACATCATAATCATGATGAAGATGAAGAT
TCAACATATTTAAGTGACGATAAAGAAAATGCAGATGTTTTTAAATAGCATAAAATTATAAC
AAACATAAATCAGGTCATAATATAAAATCAGGTTTTCCATACAACAAATGATGGGAATGTA
AATAAAAAATTTAAAAAGAAGTAAACAATATTTGATTGATAAAATAAAATGGATCTTTAT
ATGAAAACATATATTATGCACATAAAAAATAATCGTATTTACCTTTGAACATTATTTTAAT
TTATTAATAGATATTTATTAATAAATTATGATGCTTCTATTTTTTATTAATATATATAAT
AGTATTTTTTAAAAATTACAAGATGGAAAATGTAAAAGTAATGACAGAAGAGGATATATCC
AATGATAAATCATATAACTTATATGATACAAATTTTGAAGATTCATAAAAAAATAAAT
TACAAAGAAGAAGAAGAGGAAGATGAAGAAAAACGTATAAACATAAATGATATTGAA
AATAATTTATTTACTGTAAAGATGGGTAAAGCAGAAACGGAAGAAGGTGACTGGTTGTTT
ATAGAACAATTAATTATGAGTATTATGAATTTTTTCATATCTTTGTTTTAATATATATAAA
GAAAATAAAGTGAAGATTAGTAAAAAGTTATTAAGAAGATGAATATGAATGCAGATACT
GTAAGAAGAATTTGTTTAGAATTACAAAGGAAAAATAAAAGTTCTTTTTCTTATGTGGA
ATATATTTAATATATATATTACAATTTTTTAAATAAGAATATATTATATCGATTCAATTGAT
AAAATAATATATGTATTAGAAAAAATATCAAAGAATGTATACGTTAATAGTTGTATTATA
AATATATACTTAAATATGTTGCAATTAATAACTCCGAACAATATATTATATAAGAATACA
AATAATACAAATATATCTTTAAACGATAAAGATATATATATTTATATTGAAAAGGCCACA
ATATATACTGAAAGTATTAATAATATAATAAATAAATAACGTTTTATTAAAACTGAAC
AATTTTAATATTGAAAATATAATATTATCACTTTTACCTTACTTATTATATTTTAATAAT
AAGAAGGAAGAAATAAATTCACATATAGCATCAATAAATTCGGAGTGTTTACATATAATA
TCAATATATATTATAAAAGTATATACATGTATATGAACAATAATGTTAATCATAGAGAT
AATGATAAATATATAAAGATGAAGAAGAAAAGTGCAGCTGTTCTTTTGAATTCTGAATAT
GACATGGAAAACTTCATGACATTCCTTTTGAaaaaATAATTGAATTAaaaaaaATGTAT
ATATTTTTTATTAACATGTTTTGTTTTGTCTTTGGCTTGTTCTTTTAGTTCGAAAAGGACA
AGGAGTGAAGCTTACATAAAGTTGCAACAATTTTTATTTAATGAGAGTTATATATTTAA
AGAGTAAACAAAAAGGAAGATAATAATAATAATAATAATAATGATAACAATAGCAAT
AATAATAATAGTAATAGTGGAAAGATGATAAAAAATTGTAAGGAAGAAAAATATGTGTAT

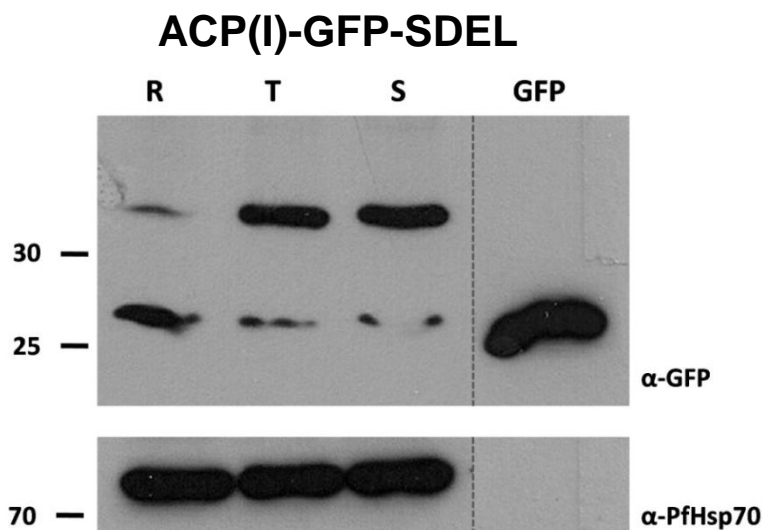
```

AGAGATGAAAAATTAATAGACCTAATAAGCAACTTTATCATTTTACCATTAATCACATAT
AATTATTATTTTCCATTTATATGTAAAAATAAATATGGAGGAATATCATCTAATGATGGG
GAAGATGGAAATATTAACAAAAGTGATAATGAAATAAAGGATAGCGAACCTTCAAGTGAA
AATTTGTTAACATTAGATCAAAATAATTATTGTAAAGAAGCATTACTAACTACAATTTA
TTTCATAAAAAAAATTATGTAAGTATTATGTCAGAAGAAATGTGGAAAAATAATGAATAT
GAAAATTGCGGTTGTATAATTAATTATAAGAATATAGAGAATATTGAAAAAGATAATATT
GTTTTAAATAATATATTGAATTATGCTAATGATTATTATATACATACTATATTACATAAA
CAATATAATTATTATTTTAGTTATTTATATGCAAAAAAATGTTAACATATGATAATGTT
TGTTATAGAAAAAGTATGAGTATTAGTTTTGTAGTCATATTATTGTTATCCTTTTTATAT
TCACTTTTAAATTGTTTCAGATGATATTTATGATGATGAAAAGAAACAAACAAATAATTTA
TTAAATAATGAATTAATAAATAACAAAACAAAGGAAACACATAATAATGATGAAGATAAC
ATTATTAATATATATTCATTGTTATGTTTAAATAATGAAGCTATGTACAACAAAATTGTT
ACCAAAGGCAAATGTGAAAATAATTGTATTTATTACTTTCTAAAACATTTCTACCATTCT
TTATTAACAATTAAGAAGAAGCAAACAAAATATTAATATATATAAAGAGACATTTATA
GAAAATATGAAGAATATCATTTATGTATCCTCTTCCTATGCTTATTGTCTAAAGGATCAT
CGTATTAGCTGTTTTTTCGCACATTAAAAATGGCCACTTCTTTTTAAGAGAACAGGAAAAA
GATATATATATTAAATTACTTAATGTACAAAATATTAATGACAAAGAATATCCTCAGGAA
TTAGATAATGATGTTGTTAAAAATATTAATAAATGCAACTCAATGTGAGAATAAGTATA
GTTATTGTGTATTATATTTTATATATGGATAATAATTCAAATGAGCAATTTAAAGCAACC
TTTGAAGAGTTATTAATGTTCTCCTAACAAAATATAGTGATAATGAACATGATGAAAAAT
GTTGAGGAAAAAAGCAAAATGATGTAAAGGAGGTTCAATCAAATGATAACAAAGATAAA
AGTGTTGTAACGAGTAAAAATGAAGATAATACAGAAAAGAACGAGGATAATGTAAACATT
ACAAATGATAAAAAAGAAGATAACGTAGAAAATTTAACGGAGGAAAAACAAAACACGTA
AACGTTTCAACTCAGGATAAAGAAGATAACGTAGAAGATTTAACGGAGGAAAAACAAAAC
AACATAAAAGATTCAACTCAAGAAAAAGAAGATAACATAAAAGATTCAACTCAGGATATA
GAAGATAATGTAGAAGATTTAATTGAGGAAAAACAAAACACATAAAAGATTCTACTCAA
GAAAAAGAAGATAACATAAAAGATTCAACCCAGGAAGTAGAAGATAACATAAAAGATTCA
ATTGAGGGAAACAAAGATGATAATGCCAATATTTCAAATGACGACGAAGAACATGAAAAA
ACCCAAGAGTTAAAGAAGAGGGAAAAGAAGATGATGCCCATTCATCTGATGAAAAAGAT
GGAAAAACAATTAA

```

Anhang 2: Prozessierung der Reporterproteine der ACP(I)-GFP-SDEL (Tonkin et al., 2006b) Parasiten über einen Entwicklungszyklus hinweg.

P. falciparum wurden mit dem ACP(I)-GFP-SDEL Konstrukt von Tonkin und Kollegen (Tonkin et al., 2006b) transfiziert und über einen Entwicklungszyklus hinweg analysiert. Die Expression des Reporterproteins erfolgt unter Kontrolle des PfHsp86 Promotors; zwischen ACP_BTS und GFP ist eine 42 bp Spacerregion eingefügt (Tonkin et al., 2006b). (R) frühes Ringstadium; (T) Trophozoitenstadium; (S) Schizontenstadium. Zu jedem Zeitpunkt wurden gleiche Zelläquivalente per SDS-Page aufgetrennt und mit anti-GFP Antikörpern immunodetektiert. Anti-PfHsp70 dient als Ladekontrolle. GFP: in *E.coli* exprimiertes GFP. Größenstandard in kDa.



Danksagung

In erster Linie möchte ich mich herzlich bei PD Dr. Jude Przyborski bedanken - für die Möglichkeit meine Dissertation bei ihm anzufertigen, für die bereitgestellte Finanzierung, und nicht zu letzt für alles, was ich während dieser Zeit lernen durfte.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Klaus Lingelbach für konstruktive Kritiken und für das kleine "breite Nudeln mit Gulasch"- Heimatgefühl im tiefsten Mittelhessen.

Herrn Prof. Dr. Maier möchte ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens einer weiteren Plasmodien-Dissertation danken.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Batschauer und Herrn Prof. Dr. Jacob für die Bereitschaft an der Prüfungskommission teilzunehmen.

Desweiteren möchte ich Dr. Chris Tonkin und Prof. Dr. McFadden für die netten Gespräche auf der MAM, für das SDEL _Reporterkonstrukt und für anti-ACP Antikörper danken.

Ein herzlichstes Dankeschön geht außerdem an Dr. Stefan Baumeister; dafür, dass mir seine Türe seit den frühesten Bachelor-Kindertagen immer offen steht.

Ich danke meinen lieben Kolleginnen und Kollegen, die über die Jahre hinweg die Arbeit und das Leben auf C4 bereichert haben. Insbesondere Simone - fürs Pipetten Starter-Set, für all das Wissen, und für die Zellkultur-Paranoia, die sie mir vererbt hat; und natürlich Luis - für alles!

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Bachelors und Masters, die regelmäßig für Chaos und frischen Wind gesorgt haben. Ganz besonders bei Anna und Jan, für ihre großartige Hilfe, wenn's mal brenzlig wurde, und für die vielen vielen Babysitter Stunden.

Danke auch an die Damen der technischen Assistenz, insbesondere an Mareike.

Von ganzem Herzen möchte ich meinen Freunden und meiner Familie danken - für ihre endlose Unterstützung, für die Schultern zum Anlehnen, die schönsten Ablenkungen und für das großartige Gefühl zuhause zu sein.

Tanja und Janek, danke, dass ihr, ganz egal wo, immer ganz nah bei mir seid!

Danke Seb, dass deine Arschritte immer die besten sind!

Papa, danke für alles, was hier hinzuschreiben jeglichen Rahmen sprengen würde!

Danke Mama, dass ich bei dir immer alles vergessen und einfach nur "Daheim" sein kann!

Manuel, dir danke ich für deine Hand!

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation

**"Proteintransport zum Apicoplasten von *Plasmodium falciparum*
- Hinweise auf einen Golgi-abhängigen Transportweg -"**

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort/Datum)

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)
